

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
Zoologisches Institut

**Molekulargenetische Analysen
aus historischem Leichenbrand und
stark degradiertem humanen Material**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Anke Heinrich
aus Stendal

Kiel, 2009

Referent/in:

Koreferent/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt:

gez.

Dekan

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Knochen.....	2
1.1.1 Aufbau von Knochen	2
1.1.2 Verhalten von Knochen bei der Verbrennung.....	3
1.2 Verbrennungspraktiken bei historischen Brandbestattungen.....	5
1.3 Dekompositionerscheinungen am Menschen	7
1.4 Humane DNA – Aufbau und Struktur	8
1.4.1 Nukläre DNA	9
1.4.1.1 Short Tandem Repeats (STRs).....	9
1.4.1.2 Artefaktbildung bei STRs während der PCR	10
1.4.2 Mitochondrien	12
1.4.2.1 Mitochondriales Genom	12
1.4.2.2 Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs)	13
1.5 Entstehung der mitochondrialen Haplogruppen	14
1.6 Molekulargenetische Untersuchungen an aDNA	17
1.6.1 Haltbarkeit von DNA	18
1.6.2 Abbau von Nukleinsäuren	19
2 Zielsetzung.....	20
3 Probenmaterial	22
3.1 Material für die Etablierung der SNP-PCRs.....	22
3.2 Material für Dekontaminationsversuche	23
3.3 Kriterien für die Auswahl der Urnengräberfelder	25
3.4 Beschreibung der Gräberfelder	26
3.4.1 Gremersdorf	26
3.4.2 Scharbeutz	26
3.4.3 Süderbrarup	27
3.4.4 Norderbrarup	28
3.4.5 Sörup II.....	28
3.5 Knochenmaterial von historischen Leichenbränden	29
3.6 Knochenmaterial von Brandleichen.....	31
3.7 Knochenmaterial von stark fäulnisveränderten Leichen	34

4 Methoden.....	36
4.1 Aufarbeitung der Proben.....	36
4.1.1 Aufarbeitung der Knochen aus dem Dekontaminationsversuch	36
4.1.2 Aufarbeitung der Knochen aus den Leichenbränden	36
4.1.3 Dekalzifizierung der Leichenbrände	37
4.1.4 Aufarbeitung der Knochen der Brandleichen.....	38
4.1.5 Aufarbeitung der Proben aus den Fäulnisleichen.....	38
4.2 DNA-Extraktion und Aufreinigung.....	38
4.2.1 DNA-Extraktion mit dem Invisorb® Forensic Kit I	38
4.2.2 Aufreinigung der DNA mit dem MinElute® PCR Purification Kit.....	39
4.2.3 Aufreinigung der DNA mit dem QIAquick® Nucleotide Removal Kit	40
4.2.4 DNA-Extraktion mit dem Invisorb® Spin Forensic Kit	40
4.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	42
4.3.1 Allgemein	42
4.3.2 Überprüfung von DNA–Qualität und –Quantität mittels Screening-PCRs	42
4.3.2.1 Duplex-PCR	42
4.3.2.2 Screening-PCR	44
4.3.2.3 Multiplex-PCR	46
4.4 Fragmentanalyse mittels Kapillarelektrophorese	48
4.5 Quantifizierung mittels Realtime-PCR	49
4.6 Sequenzierung der mitochondrialen DNA	50
4.6.1 Amplifikation mitochondrialer DNA	51
4.6.2 Kontrolle der Amplifikate auf einem Agarosegel	52
4.6.3 Aufreinigung mittels Invisorb Spin PCrapid Kit.....	53
4.6.4 Sequenzier-PCR	53
4.6.5 Aufreinigung mittels Dye Ex Kit	54
4.6.6 Sequenzierung mittels Kapillarelektrophorese.....	54
4.7 SNP Analyse.....	54
4.7.1 SNP Auswahl für die Untergruppen der Haplogruppe H.....	55
4.7.2 SNP Auswahl für die Einteilung der westeuropäischen Haplogruppen.....	57
4.7.3 Amplifikation der Fragmente in einer Multiplex-PCR	60
4.7.4 Kontrolle der Amplifikate auf einem Polyacrylamid-Gel (PAGE).....	61
4.7.5 Aufreinigung mit ExoSAP-IT®	63
4.7.6 Minisequencing mittels SNaPshot™ Multiplex-Kit	63

4.7.7 Aufreinigung mittels Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	64
4.7.8 SNP-Analyse mittels Kapillarelektrophorese.....	65
4.8 Kontaminationsvermeidung und Qualitätssicherung.....	65
4.8.1 Allgemeine Bemerkungen.....	65
4.8.2 Qualitätssicherung durch Negativkontrollen.....	65
4.8.3 Mitarbeiter	66
5 Ergebnisse.....	67
5.1 Etablierung der SNP-Analyse	67
5.1.1 Etablierung der Rahmenbedingungen der SNP-Analyse	67
5.1.2 SNP-Analyse für die Haplogruppe H Untergruppen.....	68
5.1.2.1 Entwicklung der SNP-PCR für die Haplogruppe H Untergruppen.....	68
5.1.2.2 Etablierung der SNP-PCR für die Untergruppen der Haplogruppe H	73
5.1.3 SNP-Analyse für die häufigsten westeuropäischen Haplogruppen.....	75
5.1.3.1 Entwicklung der SNP-PCR für die häufigsten westeuropäischen Haplogruppen..	75
5.1.3.2 Etablierung der Haplogruppen-PCR	77
5.1.4 Nachweisgrenzen der neu etablierten SNP-PCRs	78
5.1.5 Vergleich der Effizienz der SNP-Analyse mit anderen Methoden an forensischen Proben.....	80
5.1.5.1 Vergleich der SNP-Analyse mit der Screening-PCR.....	80
5.1.5.2 Vergleich der SNP-Analyse mit STR-Analysen an forensischen Proben.....	82
5.1.6 Haplogruppenverteilung in den forensischen Proben	86
5.2 Auswertung der Dekontaminationsversuche.....	87
5.2.1 Überprüfung des Dekontaminationserfolges mittels Duplex-PCR	87
5.2.2 Überprüfung des Dekontaminationserfolges mittels STR-Analyse	88
5.2.3 Überprüfung der Dekontamination nach Reinigung mit Bleiche.....	89
5.3 Molekulargenetische Analysen an Leichenbrand	90
5.3.1 Modifikation der Extraktionsmethode	90
5.3.2 Urnengräberfeld Gremersdorf	91
5.3.2.1 DNA-Ausbeute und Inhibition	91
5.3.2.2 Nachweis der Haplogruppe	91
5.3.2.3 Verbrennungsgrad der Proben.....	92
5.3.3 Urnengräberfeld Süderbrarup.....	93
5.3.3.1 DNA-Ausbeute und Inhibition	93
5.3.3.2 Nachweis der Haplogruppe	93

5.3.3.3 Verbrennungsgrad der Proben.....	95
5.3.4 Urnengräberfeld Sörup II	96
5.3.4.1 DNA-Ausbeute und Inhibition	96
5.3.4.2 Nachweis der Haplogruppe	96
5.3.4.3 Verbrennungsgrad der Proben.....	97
5.3.5 Urnengräberfeld Norderbrarup.....	97
5.3.5.1 DNA-Ausbeute und Inhibition	97
5.3.5.2 Nachweis der Haplogruppe	98
5.3.5.3 Verbrennungsgrad der Proben.....	98
5.3.6 Urnengräberfeld Scharbeutz.....	99
5.3.6.1 DNA-Ausbeute und Inhibition	99
5.3.6.2 Nachweis der Haplogruppe mittels SNP-PCR	99
5.3.6.3 Verbrennungsgrad der Proben.....	101
5.3.7 Vergleich der Gräberfelder.....	101
5.3.7.1 Vergleich der Anzahl an gehemmten Proben.....	101
5.3.7.2 Vergleich der DNA-Ausbeute	102
5.3.7.3 Vergleich der SNP-Analysen	104
5.3.7.4 Vergleich des Verbrennungsgrades.....	105
5.3.7.5 Einfluss des Verbrennungsgrades auf die DNA-Ausbeute	105
5.4 Molekulargenetische Analysen an Brandleichen	107
5.4.1 Quantität und Qualität der DNA abhängig vom Verbrennungsgrad.....	107
5.4.1.1 Quantitätsbestimmung mittels Duplex-PCR	107
5.4.1.2 Qualitätsbestimmung mittels Screening-PCR.....	108
5.4.2 Identifizierung über STR-Typisierung abhängig vom Verbrennungsgrad	110
5.4.3 Identifizierung über Sequenzierung der mtDNA abhängig vom Verbrennungsgrad....	112
5.4.4 Identifizierung durch Bestimmung der mtHaplogruppe abhängig vom Verbrennungsgrad	114
5.5 Molekulargenetische Analysen an fäulnisveränderten Leichen	115
5.5.1 Relative Quantifizierung des DNA-Gehaltes mittels Duplex-PCR	115
5.5.2 Absolute Quantifizierung des DNA-Gehaltes mittels Realtime-PCR.....	118
5.5.3 Identifizierung über STR-Typisierung abhängig vom Fäulnisgrad	119
5.5.4 Identifizierung über Sequenzierung der mtDNA abhängig vom Fäulnisgrad.....	121

6 Diskussion	122
6.1 Nachweis von SNPs in der forensischen Praxis	122
6.1.1 Etablierung der SNP-Analyse zur Bestimmung mitochondrialer Haplogruppen ...	122
6.1.1.1 Auswahl der verwendeten Methode für die SNP-Analyse.....	122
6.1.1.2 Auswahl und Design der Primer	123
6.1.1.3 Entwicklungsstufen der Multiplex-PCRs zum Nachweis der Haplogruppen	124
6.1.1.4 Schwierigkeiten bei der Etablierung der SNP-Analyse	126
6.1.1.5 Nachweisgrenzen	127
6.1.2 Einsatz der SNP-Analyse in der Forensik	128
6.1.3 Untersuchung der forensischen Proben	128
6.2 Dekontamination	130
6.2.1 Beurteilung der Dekontamination mittels UV-Licht.....	130
6.2.2 Beurteilung der Dekontamination mittels Bleiche	133
6.3 Leichenbrand	134
6.3.1 DNA-Qualität und Quantität	134
6.3.1.1 Modifikation der DNA-Extraktion	134
6.3.1.2 Nachweis von DNA und Inhibitoren.....	136
6.3.2 SNP-Analyse	139
6.3.3 Verbrennungskonditionen	141
6.3.4 Möglichkeit des Erhalts von DNA in Leichenbränden	142
6.3.5 Echtheit der Ergebnisse	143
6.4 Mögliche Identifizierung von Brandleichen in Abhängigkeit zum	
Verbrennungsgrad	144
6.4.1 Auswahl der untersuchten Proben	144
6.4.2 Zustand der DNA-Qualität und -Quantität nach der Verbrennung	145
6.4.3 Möglichkeit der Identifizierung über STR-Analyse.....	147
6.4.4 Identifizierung über die Analyse der mtDNA	149
6.4.4.1 Sequenzierung der mtDNA	149
6.4.4.2 Minisequenzierung der mtDNA	149
6.4.5 Vergleich der Ergebnisse mit Literaturangaben.....	150
6.5 Mögliche Identifizierung von Fäulnisleichen in Abhängigkeit zum	
Verwesungsgrad	151
6.5.1 Auswahl der untersuchten Proben	152
6.5.2 Zustand der DNA-Qualität und Quantität der Proben.....	152

6.5.3 Identifizierung über STR-Systeme und Sequenzierung	153
6.5.4 Vergleich der Ergebnisse mit Literaturangaben.....	154
7 Ausblick	156
8 Zusammenfassung	157
9 Summary.....	159
10 Anhang.....	161
10.1 Auflistung der untersuchten Urnen.....	161
10.2 Systematische Einordnung von Hydra.....	161
10.3 Geräte und Materialien	162
10.4 Reagenzien und Chemikalien.....	163
10.5 getestete Primerkonzentrationen während der SNP-Etablierung.....	165
11 Abkürzungen.....	168
12 Quellennachweis	170
12.1 Literaturverzeichnis.....	170
12.2 Internetquellen	184
12.3 Herstellerprotokolle	184
Danksagung	185
Lebenslauf.....	186
Erklärung	188

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der molekulargenetischen Bearbeitung von stark degradiertem DNA sowohl aus historischem als auch aus forensischem Probenmaterial.

Für die historischen Proben stand Leichenbrand von fünf verschiedenen Urnengräberfeldern aus der vorrömischen Eisenzeit und der römischen Kaiserzeit in Schleswig Holstein zur Verfügung. Leichenbrand ist definiert als Gesamtheit aller nichtverbrannten Rückstände eines menschlichen Körpers [Gruppe et al. 2005]. Meistens handelt es sich dabei um die mineralischen Bestandteile der Knochen. Abhängig von der Verbrennungstemperatur und -dauer können auch organische Bestandteile erhalten geblieben sein [Herrmann 1992].

Die Leichenverbrennung war in Mittel- und Nordeuropa, von der beginnenden Bronzezeit bis zum Ende der römischen Kaiserzeit, für 1.500 Jahre die dominierende Bestattungsform. Die Gründe, die zur Verbrennung der Toten führten, sind nicht bekannt. Erst mit der Christianisierung in Europa wurde die Urnenbeisetzung durch die Körperbestattung verdrängt.

Für die molekulargenetische Analyse der forensischen Proben wurden Knochenfragmente von Brandleichen in unterschiedlichen Verbrennungsstufen ausgewählt.

Des Weiteren konnten Organ- und Rippenproben von fäulnisveränderten Leichen untersucht werden.

Aufgrund der hohen Temperaturen während der Verbrennung eines Menschen sowie den Fäulnisprozessen ist bei dem ausgewählten Probenmaterial davon auszugehen, dass die DNA, wenn noch vorhanden, stark degradiert vorliegt. Mit Hilfe der molekulargenetischen Methoden soll überprüft werden, welche Analyse sich für das entsprechende Probenmaterial am besten eignet, um maximale Informationen für eine Identifizierung zu erhalten. Dazu wurde eine Methode zum Nachweis von mitochondrialen SNPs etabliert, die es ermöglicht, die häufigsten westeuropäischen Haplogruppen zu analysieren. Zusätzlich können bei einer erfolgreichen DNA-Analyse in historischen Proben auch archäologische Fragestellungen beantwortet werden.

1.1 Knochen

1.1.1 Aufbau von Knochen

Das menschliche Skelett besteht aus ca. 200 Einzelknochen, die über Gelenke in Verbindung stehen. Eine etablierte Systematisierung ist die Unterteilung nach ihrer Geometrie: lange, kurze, flache und unregelmäßige Knochen.

Lange Knochen sind die sogenannten Röhrenknochen der Extremitäten, die zentral die Diaphyse und peripher die Epiphysen aufweisen. Zu den kurzen Knochen gehören die Hand- und Fußwurzelknochen. Als flache Knochen werden die Rippen, das Brustbein, die Schulterblätter und die Knochen des Schädels bezeichnet. Unregelmäßige Knochen sind Wirbel und die Knochen der Schädelbasis. Einige Knochen im Schädel enthalten luftgefüllte Hohlräume wie das Stirnbein, das Siebbein und der Oberkiefer [Faller & Schünke 2004].

Das Knochengewebe kann makroskopisch in zwei Typen eingeteilt werden: in die Spongiosa und in die Kompakta. Beide Knochenformen sind histologisch betrachtet Lamellenknochen. In den spongiösen Anteilen sind die Lamellen gitternetzartig zu dünnen Platten und Trabekeln angeordnet. Die Freiräume dazwischen sind mit Knochenmark ausgefüllt. In der Kompakta, die die Rindenschicht des Knochens darstellt, sind die Lamellen konzentrisch zu Havers-Systemen angeordnet [Lüllmann-Rauch 2006].

Mikroskopisch ist das Knochengewebe aus verschiedenen Zelltypen und der mineralisierten Extrazellulärmatrix aufgebaut. Letzteres wird überwiegend aus Kollagenfibrillen und Hydroxylapatit-Kristallen gebildet, sowie aus geringen Mengen an Proteoglykanen und verschiedenen Glykoproteinen. Des Weiteren finden sich anorganische Ionen wie Magnesium, Fluorid und Carbonat in der Extrazellulärmatrix [Lüllmann-Rauch 2006].

Das Hydroxylapatit besteht überwiegend aus Calcium-, Phosphat- und Hydroxyl-Ionen, welches sich longitudinal an die Fibrillen anlagert, so dass der Knochen biegefest ist. Die Kollagenfibrillen sind im reifen Knochen in Schichten angeordnet und werden als Lamellen bezeichnet. In einer Lamelle sind die Fibrillen gleichsinnig ausgerichtet. Zwischen den Lamellen wechselt die Verlaufsrichtung der Fibrillen [Lüllmann-Rauch 2006]. Zehn bis zwanzig ineinandergeschachtelte Lamellen bilden ein Osteon, dass im Zentrum ein ernährendes Blutgefäß im sogenannten Havers-Kanal enthält. Die Osteone sind untereinander durch Volkmann-Kanäle verbunden. Zwischen den Osteonen befinden sich Schaltlamellen als Reste von alten Osteonen [Faller & Schünke 2004].

Die spezifischen Zellen des Knochens sind zum einen Osteoblasten, welche die Knochenmatrix bilden und zu Osteozyten werden können und zum anderen Osteoklasten,

welche die Knochenmatrix wieder abbauen. Durch das Zusammenspiel von Osteoblasten und Osteoklasten ist der Knochen ständig im Umbau. Die Osteozyten sind vollständig von der mineralisierten Knochenmatrix umschlossen und liegen zwischen den Lamellen. Dabei durchziehen die Ausläufer der Zellen die Kanälchen zwischen den Lamellen und stehen über „gap junctions“ mit der Nachbarzelle in Verbindung und dienen somit der Erhaltung des Knochens [Lüllmann-Rauch 2006]. Eine Übersicht des schematischen Knochenaufbaus ist in Abbildung 1 dargestellt.

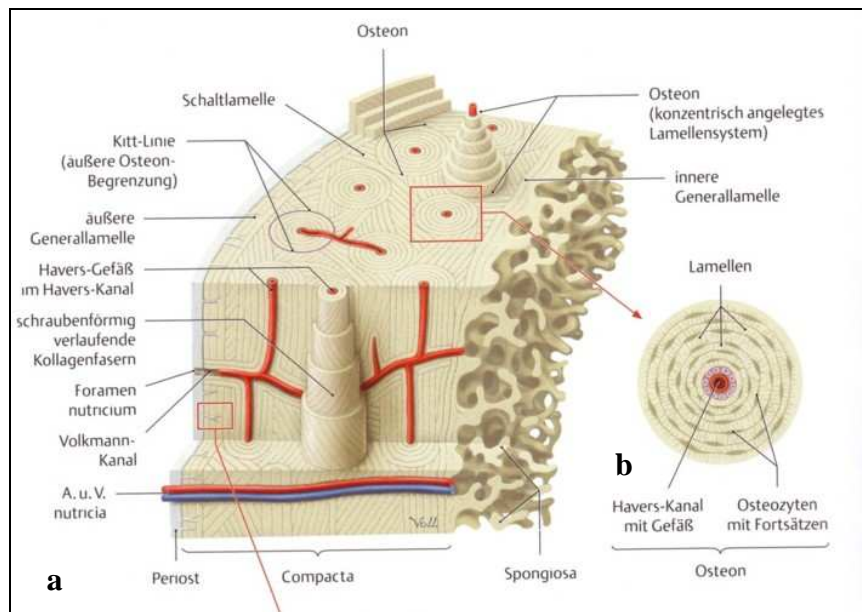


Abb. 1: Ausschnittsvergrößerung der Compacta (a).

Dargestellt sind die ca. 1 cm langen gefäßführenden Osteone als Baueinheit des kompakten Knochengewebes. Die Havers-Kanäle stehen durch die Volkmann-Kanäle untereinander und mit den Gefäßen des Periosts sowie mit den Gefäßen des Markraums in Verbindung.

b Detailansicht aus a: Feinbau des Osteons. Um den Havers-Kanal sind die Osteozyten und Extrazellulärmatrix als Lamellensysteme angeordnet [aus: Schünke et al. 2005].

1.1.2 Verhalten von Knochen bei der Verbrennung

Der Grad der Verbrennung am menschlichen Knochen ist sehr variabel und hängt zum einen von der Dicke der umgebenen Gewebe und zum anderen von der Position des Leichnams ab. Daher verbrennen zuerst die Knochen mit dem geringsten Schutz und der geringsten Gewebetiefe. Meist sind das die Extremitäten, die weiter entfernt vom Torso liegen und somit den Flammen stärker ausgesetzt sind [Symes et al. 2008].

Während der Verbrennung durchläuft der Knochen verschiedene Veränderungen. Da die Hitze von außen auf den Knochen einwirkt, verbrennt dieser immer von außen nach innen, wobei sich der kalzinierte Bereich auf der Knochenoberfläche befindet und die schwarz verkohlten Anteile im Knocheninneren. Der visuell sichtbare Farbwechsel bei

hitzeveränderten Knochen verläuft von gelblich (unverbrannt) über dunkelbraun bis schwarz (karbonisiert) sowie blau und grau bis zu weißen-aschfarbenen (kalziniert) Farbtönen.

Laut einer Studie von Bonucci und Graziani von 1975, welche von Devlin zitiert wurde, ist es möglich, anhand der Farbe des verbrannten Knochens auf die wahrscheinlich erreichte Temperatur zu schließen. So korreliert ein ocker bis bräunlich verfärbter Knochen mit Temperaturen von 200-300 °C und schwarze mit 300-350 °C. Bei grauverfärbten Knochen werden Temperaturen von 550-600 °C und bei weißen Knochen über 650 °C erreicht [Devlin & Herrmann 2008].

Während der Verbrennung durchläuft der Knochen auch einen chemischen Wandel, der in der Literatur gut dokumentiert ist (siehe Abbildung 2). Ab etwa 250 °C bis etwa 600 °C beginnt das organische Material zu degradieren, weil es nicht mehr vom Knochenmineral geschützt wird. Auch das ungebundene Wasser verdampft, dass vorher im Mineral gebunden war, und es kommt zu einer geringen Schrumpfung. Wenn eine Temperatur zwischen 500 °C und 800 °C erreicht wird, verbrennt der organische Kohlenstoff vollständig. Oberhalb von 800 °C wird das Knochenapatit mit Hilfe von Diphosphaten zu Tricalciumphosphat umgewandelt und der Knochen verfestigt sich. Es kommt zu einer Schrumpfung der Skelettelemente, die 10 % in jede Raumrichtung betragen kann. Durch die entstandenen Calciumphosphate, die eine relativ geringe Löslichkeit aufweisen, sind die Erhaltungsaussichten für Leichenbrand besser als bei Körperbestattungen. Ab einer Temperatur von 1600 °C beginnt der Knochen zu schmelzen [Gruppe et al. 2005, Devlin & Herrmann 2008, Herrmann et al. 1990].

Durch die chemischen Veränderungen wandeln sich auch die physikalischen Eigenschaften. Mit dem Anstieg der Temperatur bis 800 °C werden die Knochen kreidig und erreichen ihr Festigkeitsminimum. Besonders schwarz bis grau verbrannte Knochen sind sehr fragil. Ist der kritische Punkt von 800 °C überschritten, nimmt die Festigkeit wieder zu [Herrmann 1992, Herrmann et al. 1990, Devlin & Herrmann 2008].

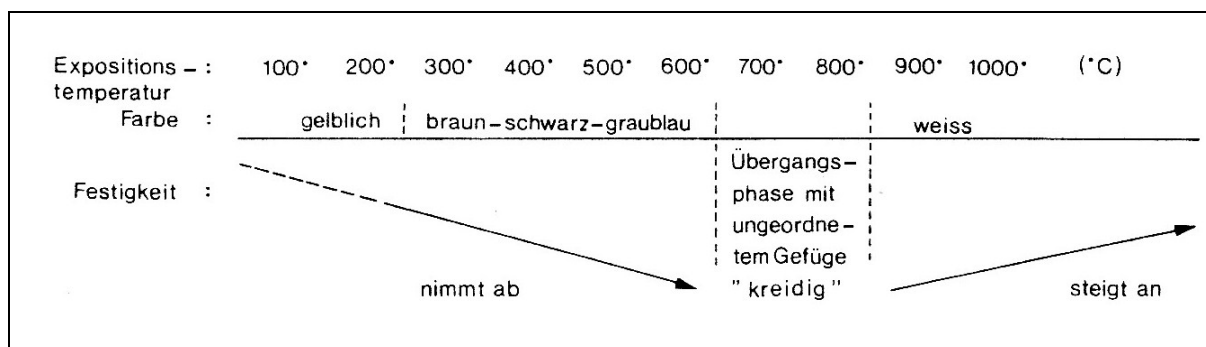


Abb. 2: Änderung der Materialeigenschaften von experimentell gebrannten Knochen bei steigender Temperatur [aus: Herrmann 1990, S. 259].

Auch das Strukturgefüge im Knochen ist bei der Verbrennung Veränderungen unterworfen. Es kommt zu einer Homogenisierung der Binnenstruktur. Jedoch bleiben die relevanten Unterschiede zwischen den Osteonen in der Mineralverteilung erhalten und eine Altersbestimmung an histologischen Schnitten ist weiterhin möglich [Herrmann et al. 1990, Herrmann 1992].

Bei der Verbrennung von Knochen sind teilweise auch Hitzerisse oder Frakturen zu beobachten. Diese entstehen, ähnlich wie bei den Muskeln, durch Eiweißgerinnung und Knochenschrumpfung in Abhängigkeit vom Mineralgehalt des Knochens. Dabei ändert sich die oben erwähnte Struktur des Knochens und es entstehen z.B. longitudinale Frakturen parallel zu den Kanälen der Osteone sowie transverse und gekrümmt transverse Frakturen. Am Schädel sind dann häufig Abplatzungen der äußeren Knochenschicht zu beobachten [Symes et al. 2008].

1.2 Verbrennungspraktiken bei historischen Brandbestattungen

Brandbestattungen sind archäologisch bis ins Pleistozän zurückzuverfolgen. Der älteste bekannte Leichenbrand stammt vom Lake Mungo (Australien) und ist 40.000 Jahre alt. In Mitteleuropa sind erste Funde aus dem Neolithikum (8.000-2.200 Jahre vor Chr.) bekannt und in der Bronzezeit (2.200-800 Jahre vor Chr.) galt es als vorherrschende Bestattungssitte. Die Wende zur Körperbestattung begann im dritten Jahrhundert in Mitteldeutschland und wurde durch die fortschreitende Christianisierung in ganz Europa verbreitet. Auch in Nordamerika (bei den Hohokam und Mogollon Kulturen) waren die Leichenverbrennungen ein üblicher Bestattungsbrauch. Im 18. Jahrhundert wurden Brandbestattungen in Deutschland nicht nur aus religiösen, sondern auch aus rationellen Gründen, wie Platzmangel und Hygiene, wieder eingeführt. Hier wurde auch der Begriff der Feuerbestattung erstmals verwendet sowie Krematorien eröffnet. Heute wird in Mitteldeutschland fast ausschließlich die Feuerbestattung gewählt [Schurr et al. 2008, Becker et al. 2005].

Bei einer Verbrennung in einem modernen Krematorium wirken sehr hohe Temperatur (bis zu 1.000 °C) für etwa zwei Stunden auf den Leichnam ein. Das reicht aus, um einen Menschen vollständig zu verbrennen. Die verbrannten Knochen haben meist eine graue bis weiße Färbung und sämtliche organische Bestandteile sind verloren [Schultz et al. 2008].

Bei historischen Verbrennungen wurde der Leichnam auf einen Scheiterhaufen gelegt und im Freien verbrannt. Solch ein Brand wurde von verschiedenen Faktoren beeinflusst: Witterung, Feuchtigkeitsgehalt und Brenneigenschaft des eingesetzten Holzes, Konstruktion und

Brandverhalten des Scheiterhaufens sowie Körpermasse des Leichnams. Generell musste der Scheiterhaufen so konstruiert sein, dass eine schnelle und gleichmäßige Entzündung stattfinden konnte und hohe Temperaturen über längere Zeit gewährleistet waren, damit ein Leichnam vollständig kremierte.

In einem Experiment einer archäologischen Arbeitsgruppe konnte bei der Verbrennung von Schweinekadavern auf einem Scheiterhaufen nachgewiesen werden, dass schnell hohe Temperaturen erreicht wurden und diese auch für längere Zeit bestanden. Allerdings ist neben der Temperaturhöhe auch die Einwirkdauer entscheidend. Dabei hängt der Grad der Verbrennung von der tatsächlich erreichten Temperatur im Gewebe ab. Im Experiment brannten die Scheiterhaufen fast sieben Stunden und erzielten Temperaturen von etwa 1.000 °C. Trotzdem verbrannten die Kadaver teilweise nur unvollständig. Einige Gewebereste waren lediglich hitzefixiert, so dass die Temperaturen im Inneren der Körper 100 °C nicht überschritten. Des Weiteren konnte im Experiment nachgewiesen werden, dass langsames Erhitzen die Knochen stark fragmentiert, wohingegen im Krematorium vergleichsweise große Fragmente erhalten bleiben [Becker et al. 2005].

Das sich die Technik der Leichenverbrennung weiter entwickelt haben muss, zeigt der Vergleich von Leichenbränden aus der vorrömischen Eisenzeit (500–0 vor Chr.) und der römischen Kaiserzeit (0–375 nach Chr.). Die Knochenreste der vorrömischen Eisenzeit weisen gelegentlich dunklere grau-braune Verfärbungen auf, die den Eindruck erwecken, dass in dieser Zeitspanne tendenziell schlecht oder zumindest ungleichmäßig verbrannt worden ist. In der römischen Kaiserzeit, speziell in der jüngeren Kaiserzeit (200–400 nach Chr.) und dort mit steigender Tendenz, wurde der Leichenbrand durchgehend kalkweiß und – so scheint es – härter. Zudem wurden die Fragmente kleiner. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass in der römischen Kaiserzeit länger und besser verbrannt wurde [Gebühr, persönliche Korrespondenz].

Solche Veränderungen sind auch von Wahl [1988] für das Urnengräberfeld Süderbrarup beschrieben worden. Dieses Gräberfeld wurde in der römischen Kaiserzeit und der Völkerwanderungszeit belegt. Beide Epochen wurden von den Archäologen in neun Zeitstufen eingeteilt. Wahl schreibt: „Im südlichen Bereich war die nachweisbare Expositionstemperatur in den frühesten Zeitstufen durchschnittlich geringer, in den Zeitstufen vier und fünf allerdings etwas höher als in Zeitstufe neun. Das nördliche Teilgräberfeld enthält in den mit vier und fünf teilweise parallel Zeitstufen sechs und sieben ebenfalls leicht über dem späteren Mittelwert anzusetzende Verbrennungsgrade“ [Wahl 1988, S. 48]. Das bedeutet, dass in den Zeitstufen eins bis drei (0–300 nach Chr.) die Verbrennungstemperatur

zu den Stufen vier/fünf bzw. sechs/sieben (ca. 300–400 nach Chr.) deutlich ansteigt, bis sie in der Stufe neun (400–525 nach Chr.) wieder leicht absinkt. Stufe neun ist die Epoche unmittelbar vor dem Abbruch des Gräberfeldes und kennzeichnet den völligen Zusammenbruch der Besiedlung der Landschaft Angeln, in dem das Urnengräberfeld Süderbrarup gefunden wurde.

1.3 Dekompositionserscheinungen am Menschen

Dekomposition besteht aus zwei Prozessen: Autolyse und Fäulnis.

Als Autolyse wird die „postmortale Veränderung der Gewebe eines Makroorganismus durch körpereigene Enzyme ohne die Beteiligung von Mikroorganismen“ bezeichnet [Krause & Jachau 2003, S. 47]. Da die Autolyse ein chemischer Prozess ist, wird er durch Wärme beschleunigt und durch Kälte verlangsamt. Bei einer Gefrierung wird der Autolyseprozess gestoppt. Außerdem werden bei der Autolyse Organe mit vielen Enzymen schneller zersetzt als Organe mit weniger Enzymen [Krause & Jachau 2003, DiMaio & DiMaio 1993].

Fäulnis dagegen ist definiert als „fortschreitende anaerob-bakterielle Leichenzersetzung durch überwiegend reduktive Prozesse mit Entwicklung faulig riechender Gase“ [Krause & Jachau 2003, S. 48]. Nach dem Tod gelangen die Bakterien der Darmflora ins Gefäßsystem und verteilen sich über den ganzen Körper.

Während des Fäulnisprozesses gelangt zunehmend Luftsauerstoff in die tieferen Gewebe und die Lebensbedingungen für die anaeroben Bakterien werden schlechter. Durch den Luftsauerstoff kommt es zur Besiedlung von aeroben Bakterien und unter Umständen auch von niederen Pilzen. Die Verflüssigung der Gewebe durch die Fäulnis geht in einen trockenen Gewebszerfall über [Krause & Jachau 2003].

Die weiteren Abbauprozesse werden daher als Verwesung bezeichnet und sind definiert als „fortschreitende aerob-mikrobielle Leichenzersetzung durch überwiegend oxidative Prozesse mit Entwicklung stechend-muffig riechender Gase“ [Krause & Jachau 2003, S. 49].

Unter bestimmten Bedingungen können auch konservierende Leichenerscheinungen auftreten. Ein Beispiel dafür ist die Mumifizierung. Diese entsteht, wenn warme, trockene, bewegte Luft an die Leiche gelangt und somit Wasser entzogen wird. Daher ist eine Teilmumifizierung an den äußersten, vorstehenden Körperteilen schon nach einer Woche möglich. Eine natürliche, vollständige Mumifizierung entsteht über Monate. Ein weiteres Beispiel für konservierende Leichenerscheinungen ist die Fettwachsbildung. Sie entsteht bei kühlen Temperaturen und hoher Feuchtigkeit. Dabei wird das Körperfett durch Bakterienenzyme in ungesättigte

Fettsäuren hydriert und gehärtet. Diese Fettwachsbildung betrifft meist nur einzelne Körperregionen, während der Rest weiter der Fäulnis ausgesetzt ist. Auch kann es über einen längeren Zeitraum zur Entstehung ganzer Fettleichen kommen [Krause & Jachau 2003, DiMaio & DiMaio 1993].

1.4 Humane DNA – Aufbau und Struktur

Die Grundeinheit des Lebens ist die Zelle. Ein Mensch besteht aus fast 10^{14} Zellen [Robertson et al. 1990], die alle ursprünglich aus einer diploiden Zelle entstanden sind. Damit besitzt jede Zelle die gleichen genetischen Informationen. Diese Informationen sind auf der Desoxyribonukleinsäure (DNA) als komplexes Molekül im Zellkern (Nukleus) und als weniger komplexes Genom in den Mitochondrien jeder Zelle verschlüsselt.

Die DNA ist ein Polymer aus Nukleotiden, die durch Pyrophosphat-Abspaltung aus Nukleosidtriphosphaten polymerisiert wird. Eine Nukleotid-Einheit setzt sich aus drei Teilen zusammen: einer spezifischen stickstoffhaltigen Base (einer Purin- oder Pyrimidinbase), einem Zucker (Desoxyribose) und einer Phosphorsäure. Insgesamt können vier verschiedene Basen in einem DNA-Strang eingebaut sein. Diese sind die Purinbasen Adenin (A) und Guanin (G) und die Pyrimidinbasen Cytosin (C) und Thymin (T) [Murken et al. 2006].

Die Nukleotidabfolge in der DNA wird als genetischer Code bezeichnet. Zudem ist die DNA doppelsträngig aus zwei antiparallelen Nukleotidsträngen, die in Form einer α -Doppelhelix vorliegen, aufgebaut. An den Enden des Stranges befindet sich entweder eine 3'-OH-Gruppe des Zuckermoleküls oder eine 5'-Phosphorsäuregruppe, welche nicht verestert ist. Damit hat die DNA eine Richtung [Murken et al. 2006].

Die DNA erfüllt zwei wichtige Funktionen: (1) sie kopiert sich selbst, damit die Zellen sich teilen können und die neuen Zellen die gleichen genetischen Informationen tragen; (2) und sie trägt die Anleitung für die Proteinbiosynthese. Die Botschaften, die direkt in der DNA-Struktur festgelegt sind, werden von Generation zu Generation vererbt, indem jeweils die Hälfte der DNA-Information von der Mutter und vom Vater an das Kind weitergegeben wird [Butler 2005].

1.4.1 Nukläre DNA

Der Mensch hat einen artspezifischen diploiden Chromosomensatz in fast allen Zellen. Das bedeutet, dass die Zellen über einen maternal und einen paternal vererbten Chromosomensatz, bestehend aus jeweils 22 Autosomen und einen Gonosom, verfügen, die homologe Paare bilden. Bei den Gonosomen erfolgt eine Unterscheidung zwischen X- und Y-Chromosom. Einige Gewebe besitzen polyploide Zellen wie z.B. tetraploide Leberzellen, die 92 Chromosomen besitzen und Muskelzellen mit vielen Zellkernen. Erythrozyten dagegen sind kernlos. Die Geschlechtszellen eines Menschen weisen nur einen haploiden Chromosomensatz mit 23 Chromosomen auf [Brinkmann & Wiegand 1997].

Eine einzelne Kopie des menschlichen Genoms (haploid) besteht aus etwa 3×10^9 Basenpaaren [Brinkmann & Wiegand 1997].

Nukleäre DNA setzt sich aus kodierenden und nicht-kodierenden Bereichen zusammen. Die kodierende Region, auch Gen genannt, enthält die Information zur Proteinbiosynthese. Der Anteil nicht kodierender DNA zwischen den Transkriptionseinheiten der Gene wird auf 75 % geschätzt. Werden Introns ebenfalls berücksichtigt, enthalten ca. 99 % des Genoms keine kodierenden Nukleotidsequenzen [Murken et al. 2006].

In der Forensik werden für die Identifizierungen nur Marker eingesetzt, die in den nicht-kodierenden Regionen, entweder zwischen den Genen oder innerhalb der Gene, liegen und damit keine genetischen Informationen kodieren [Butler 2005].

Über 99,7 % der DNA-Moleküle sind identisch zwischen den Menschen. Nur ein kleiner Teil von 0,3 % oder ca. zehn Millionen Nukleotiden unterscheidet sich zwischen den Individuen. Dadurch ist eine Identifizierung jedes einzelnen Menschen möglich.

1.4.1.1 Short Tandem Repeats (STRs)

Short Tandem Repeats oder auch Mikrosatelliten sind 2-6 bp lange Wiederholungseinheiten. Die Anzahl der Wiederholungen innerhalb eines STR-Markers kann zwischen den einzelnen Individuen sehr variabel sein. Somit handelt es sich um einen Längenpolymorphismus. STRs sind meist kleiner als 0,3 kb und auf allen Chromosomen zu finden [Weispfenning 2004]. Daher eignen sich STRs besonders gut für die menschliche Identifizierung.

Eingeführt wurden diese Systeme unter der Terminologie short tandem repeats von Edwards und Mitarbeitern 1991, wobei Systeme beschrieben wurden, deren Fragmentlängen unter 400 bp lagen und deren Repeatmotive drei bzw. vier Nukleotide betrug. Insgesamt wird die

Anzahl an tri- und tetrameren Repeatpolymorphismen auf ca. 200.000 geschätzt [Brinkmann & Wiegand 1997].

Einige Dutzend dieser STRs wurden speziell für die Schaffung des „genetischen Fingerabdrucks“ erforscht, wobei die meisten dieser Systeme Tetranukleotide sind, da sie sich als weniger anfällig gegenüber Artefaktbildungen während der PCR auszeichnen [Weispfenning 2004].

STR-Systeme, durch ihre geringe Größe relativ degradationsunempfindlich, können eine Nachweisgrenze von bis zu 100 pg aufweisen [Brinkmann & Wiegand 1997].

Die Benennung der STR-Marker erfolgt in Abhängigkeit von der Position, an welcher sich der Marker befindet. Marker, innerhalb eines Genes, werden nach dem Gen bezeichnet. STR-Systeme, die im nicht-kodierenden Bereich zwischen den Genen liegen, werden durch ihre Position im Chromosom benannt [Butler 2005].

Ein weiteres Typisierungssystem, welches kein STR-System ist, dient der Geschlechtsbestimmung. Es handelt sich hier um eine Deletionsvariante im Intron 1 des Amelogeningens. Auf dem Y-Chromosom ist das Fragment 112 bp lang und auf dem X-Chromosom wird die 106 bp lange Deletionsvariante generiert [Brinkmann & Wiegand 1997].

1.4.1.2 Artefaktbildung bei STRs während der PCR

- Allel drop out und Allel drop in

Artefakte entstehen, abhängig vom Degradationsgrad der DNA, während des PCR-Prozesses. Diese äußern sich in der Produktion unvollständiger STR-Profile durch Allel drop out besonders bei größeren STR-Loci [Arismendi et al. 2004].

Allel drop out bildet sich durch bevorzugte Amplifikation eines Allels bei heterozygoten Paaren während der ersten PCR-Zyklen. Das andere Allel ist dadurch unterrepräsentiert und kann nicht mehr detektiert werden. Es handelt sich dabei um einen stochastischen Effekt. Auch die generell beobachtete Unausgeglichenheit der Signalhöhenintensität bei heterozygoten Loci lässt sich auf das Prinzip der bevorzugten Amplifikation eines Allels zurückführen [Kloosterman & Kersbergen 2003]. Allerdings kann Allel drop out auch auftreten, wenn in einem Allel der zu amplifizierende Bereich, die Primerbindungsstelle oder der flankierende Bereich, nicht mehr vollständig vorliegt. Dadurch kann dieses Allel nicht amplifiziert werden und wird auch nicht mehr detektiert [Butler 2005].

Um Allel drop out von homozygoten Loci unterscheiden zu können, sollte die Fläche unter dem Signal mehr als 10.000 relative Fluoreszenzeinheiten (rfu) betragen [Kloosterman & Kersbergen 2003].

Allel drop in dagegen sind zusätzliche Allele, die durch sporadische Kontaminationen des DNA-Extraktes oder der PCR-Reagenzien auftreten [Butler 2005].

- Locus drop out

Wenn beide Allele in einem STR-System ausfallen, wird dies als Locus drop out oder Nullallel bezeichnet. Dieses Phänomen wird meist durch einen Fehler in der Primerbindungsstelle verursacht [Butler 2005].

Nullallele entstehen ebenfalls, wenn zu wenig DNA in die PCR eingesetzt wird oder diese sehr degradiert vorliegt. Ein kompletter Ausfall aller Systeme kann auftreten, wenn die Polymerase durch Inhibitoren blockiert wird. Nullallele sind im Gegensatz zu Locus drop out kein stochastisches Problem. Allerdings sind meistens die größeren Fragmente von Nullallelen betroffen [Kloosterman & Kersbergen 2003].

- Stotterpeaks

Stotterpeaks sind zusätzliche Signale, die „fälschlicherweise“ neben dem Hauptallel auftreten. Diese sind oft eine Wiederholung kürzer als das Hauptallel und entstehen durch eine Polymerase-Fehlreaktion während der PCR. Es wird davon ausgegangen, dass die Polymerase während der Synthese im repetitiven Bereich vom DNA-Strang abbricht. Zwar setzt sie die Synthese fort, kann aber die genaue Abbruchstelle nicht finden, begründet durch die sich gleichende Repeatstruktur. Unter den Tetranukleotiden sind besonders D21S11, D3S1358, FGA und vWA für Stotterbanden anfällig. Pentanukleotide wie Penta D und Penta E dagegen haben nur ein sehr geringes Stottervorkommen und sind deshalb besonders bei der Analyse von Mischspuren vorteilhaft [Weispfenning 2004].

1.4.2 Mitochondrien

Mitochondrien sind Zellorganellen, die in fast allen Eukaryotenzellen vorkommen. Die meisten Zellen besitzen je nach ihrer Stoffwechselaktivität hunderte bis tausende dieser Organellen. In ihrer Größe sind sie mit Bakterien vergleichbar. Es wird angenommen, dass sie aus Archaeobakterien hervorgegangen sind, die in primitiven Wirtszellen symbiotisch lebten.

Jedes Mitochondrium ist von einer Doppelmembran umgeben. Die äußere Membran ist glatt und die innere ist durch starke Einfaltungen gekennzeichnet. Die Matrix (der von der inneren Membran umschlossene Raum) enthält Ribosomen, mitochondriale DNA und Enzyme des Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsels. Trotz der eigenen DNA werden die meisten Proteine im Cytosol der Zelle durch die Anweisung der Messenger-DNA aus dem Zellkern synthetisiert. Damit sind Mitochondrien halbautonome Organellen, die im Zellinneren wachsen und sich vermehren [Campbell 1997].

1.4.2.1 Mitochondriales Genom

Das Mitochondrium besitzt ein eigenes zirkuläres Genom, das 16569 Basenpaare umfasst und vollständig sequenziert ist [Anderson et al. 1981]. Es befindet sich in der Matrix des Mitochondriums und liegt in mehreren Kopien vor.

Auf dem mtGenom sind 13 Proteine der Atmungskette, 22 Gene der transfer RNA und zwei Gene der ribosomalen RNA kodiert. Alle anderen mitochondrialen Produkte werden von nukleären Genen verschlüsselt. Im Vergleich zum nukleären Genom, das nur einmal im Zellkern vorkommt, sind im Mitochondrium bis zu zehn Kopien des mtGenoms enthalten. Die zirkuläre DNA besteht aus zwei komplexen Strängen, dem guaninreichen äußeren H-(heavy)Strang und dem inneren cytosinreichen L-(light)Strang. Des Weiteren besitzt die mtDNA keine Introns und nur drei nicht-kodierende Regionen. Auch Histone und effiziente Reparaturmechanismen sind bei der mtDNA nicht existent und durch die asexuelle Vermehrung erfolgt keine Rekombination. Allerdings liegt die Mutationsrate zehn- bis 20-fach höher als bei der nukleären DNA [Murken et al. 2006]. Am variabelsten ist dabei die Kontrollregion im sogenannten D-Loop, einem nichtkodierenden Bereich. In diesem Bereich befindet sich der Replikationsursprung des H-Strangs und die Transkriptionssignale für beide Stränge (siehe Abbildung 3). Die größte Sequenzvariabilität ist in zwei je ca. 400 bp langen Bereichen des D-Loops vorhanden [Brinkmann & Wiegand 1997].

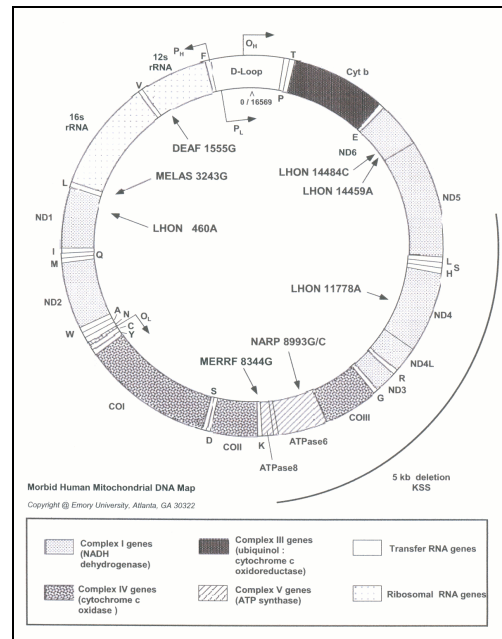


Abb. 3: Das humane mitochondriale Genom.

Mit einem Pfeil markiert sind die Bereiche, die häufig Mutationen aufweisen und im Zusammenhang mit bestimmten Erkrankungen stehen. Die durchgezogene Linie auf der rechten Seite zeigt die 4977 bp common deletion [aus: www.mitomap.org, Stand 15.06.09].

1.4.2.2 Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs)

Single Nucleotide Polymorphismen sind Sequenzpolymorphismen, die sich als eine Position auf der DNA definieren, bei der zwei oder mehr alternative Basen mit einer geschätzten Häufigkeit von über 1 % in der menschlichen Population vorkommen [Brookes 1999].

Die Untersuchung von SNPs kann in vielen Bereichen der Forschung genutzt werden. So können einige SNPs im kodierenden Bereich Krankheiten verursachen oder begünstigen. Durch deren Nachweis ist eine exakte Diagnose oder eine frühzeitige Einordnung in Risikogruppen möglich [Marsh et al. 2003]. Aber auch im nichtkodierenden Bereich gibt es SNPs, die für die Phylogenetik und somit für die Klärung der menschlichen Evolution und der Migration herangezogen werden können [Zerjal et al. 1997].

Auch in der Forensik werden SNPs im nichtkodierenden Bereich immer häufiger bei der Identifikation von Leichen und Leichenteilen [Budowle et al. 2005], bei der Zuordnung von biologischen Spuren zu den Spurenverursachern, sowie zur Erstellung von Abstammungsgutachten eingesetzt [Børsting et al. 2008]. Meist beschränken sich diese Analysen jedoch noch auf die mitochondriale sowie Y-chromosomale DNA.

SNPs entstehen durch Mutationen, die der Selektion unterliegen. Im nichtkodierenden Bereich sind Mutationen für das Überleben nicht relevant. Sie bleiben häufig erhalten und werden weitervererbt. Im kodierenden Bereich konnten aber nur Mutationen bestehen bleiben,

die das Überleben eines Organismus verbessern oder nicht beeinträchtigt haben [Murken et al. 2006].

Zwei nichtverwandte menschliche Genome unterscheiden sich durchschnittlich einmal pro 1.000 Basenpaaren [Armstrong et al. 2000]. Mehr als zehn Millionen häufige SNPs wurden bisher kartiert, davon liegen etwa 60.000 in den kodierenden Bereichen [Murken et al. 2006]. Diese Punktmutationen können Substitutionen sowie Deletionen und Insertionen einzelner Nukleotide umfassen. Bei der Substitution wird zwischen Transition und Transversion unterschieden. Bei einer Transition (63 %) wird eine Pyrimidinbase gegen eine andere Pyrimidinbase ausgetauscht bzw. eine Purinbase gegen eine andere Purinbase. Bei einer Transversion (27 %) dagegen wird eine Pyrimidinbase durch eine Purinbase bzw. eine Purinbase durch eine Pyrimidinbase ersetzt. Unter Berücksichtigung aller Mutationsmechanismen nehmen die Substitutionen mit 68 % den größten Anteil im menschlichen Genom ein [Murken et al. 2006].

1.5 Entstehung der mitochondrialen Haplogruppen

Haplogruppen sind definiert als Gruppe einer Art, deren Individuen gemeinsame genetische Merkmale besitzen.

Anhand der mtDNA-Sequenzen von Menschen verschiedener Populationen und deren Einordnung in Haplogruppen wurde ein phylogenetischer Stammbaum erstellt. Dieser Stammbaum basiert auf einem monogenetischen Ursprung und stützt somit die Out-of-Africa-Hypothese (auch bekannt als Arche-Noah-Modell, Replacement-Hypothese, Eva-Hypothese oder Lucky-Mother-Hypothese), die mittels anatomisch-morphologischer Merkmale postuliert wurde [Buselmaier & Tariverdian 2006].

Als Grundlage für den Stammbaum dient die Überlegung, dass Matrilinearität bei Geschwistern den geringsten Abstand aufweisen, da für Neumutationen nur eine Generation Zeit gegeben ist. Desto mehr die Verwandtschaft abnimmt, um so größer ist der genetische Unterschied. Dabei wird der Kreis, der über Matrilinearität verwandten Menschen, immer größer, je länger die Zeit zurückverfolgt wird, bis eine gemeinsame Vorfahrin der mtDNA gefunden ist [Buselmaier & Tariverdian 2006].

Verschiedene Untersuchungen [Cann et al. 1987, Ingman et al. 2000, Yu et al. 2002] ergaben, dass sich die mtDNA-Sequenzen unter Afrikanern stärker unterscheiden als in allen anderen ethnischen Gruppen. Somit stand die Wiege der Menschheit in Afrika und die gemeinsame Urmutter lebte dort vor ca. 150.000 bis 200.000 Jahren [Coble et al. 2004].

Im Vergleich der genetischen Variabilität mit anderen Arten zeigen sich innerhalb der heute lebenden Bevölkerung nur geringe Unterschiede. Diese geringe Differenziertheit deutet auf einen „Flaschenhalseffekt“ im Laufe der humanen Evolution hin. Daraus folgt, dass kleine Gründerpopulationen die Besiedlung vollzogen [Buselmaier & Tariverdian 2006].

Ältere Arbeiten aus den siebziger Jahren gingen davon aus, dass Europa während der Neolithischen Revolution von einer größeren Bevölkerungsbewegung besiedelt wurde, die für die beobachtete Variabilität verantwortlich sein sollte. Neuere Untersuchungen der mitochondrialen Haplogruppen weisen dagegen eine relative Homogenität auf. Somit müssen die Frequenzvariationen durch frühere Besiedlungswellen entstanden sein [Grupe et al. 2005]. Ein Modell nach Richards et al. [2000] geht davon aus, dass vier große Migrationswanderungen erfolgten, die anhand von archäologischen und paläoklimatischen Fakten rekonstruiert wurden. So soll die erste Einwanderungswelle im frühen Jungpaläolithikum (vor 45.000 J.), die zweite im mittleren Jungpaläolithikum (vor 26.000 J.) und die dritte im späten Jungpaläolithikum (vor 14.500 J.) stattgefunden haben. Etwa 20 % der genetischen mitochondrialen Variabilität entwickelte sich durch die vierte Einwanderungswelle vor ca. 9.000 Jahren.

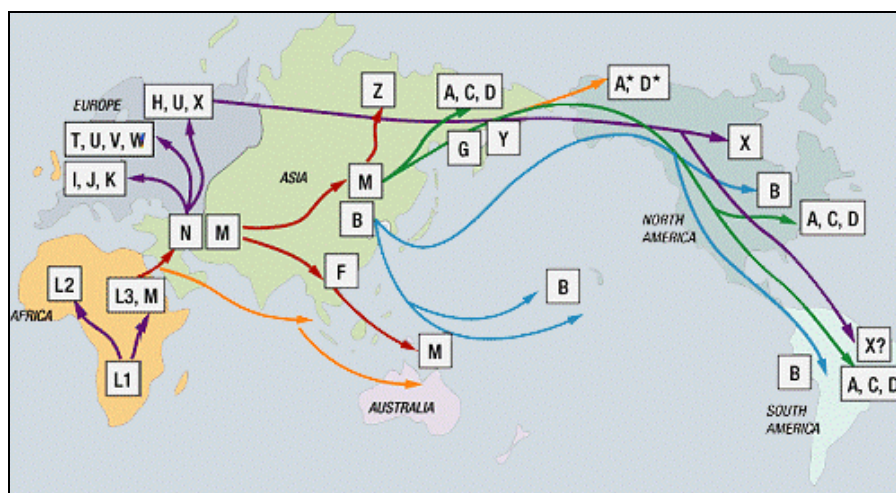


Abb. 4: Geographische Verteilung der mitochondrialen Haplogruppen.
[aus: www.igeneea.com, Stand: 6.6.09]

In Abbildung 4 ist die geographische Verteilung der mitochondrialen Haplogruppen weltweit dargestellt. In Afrika, südlich der Sahara, dominiert die Haplogruppe L mit ihren Subhaplogruppen. Diese finden sich auch in Nordafrika (50 %) und vereinzelt in Europa und Westasien wieder. Der Rest der Welt ist den Haplogruppen M und N zuzuordnen. Die Subhaplogruppe M1 findet sich auch in 20 % der Bevölkerung in Äthiopien. Somit liegt der Ursprung der Haplogruppe M ebenfalls in Afrika. Die Haplogruppe M verbreitete sich im asiatischen Raum sowie in Amerika und Australien. Dazu gehören die Haplogruppen D und

CZ, wobei unter CZ die Haplogruppen E, Q, C und Z zusammengefasst sind. Zur Haplogruppe N, die vorwiegend in Europa und Vorderasien anzutreffen ist, gehören die Haplogruppen W, X, I, A und R. Die Haplogruppe R wird weiter unterteilt in B, F, JT, HV und UK, wobei sich die Gruppen JT zu J und T spalten, wie auch HV in H und V, sowie UK in U und K (siehe Abbildung 5).

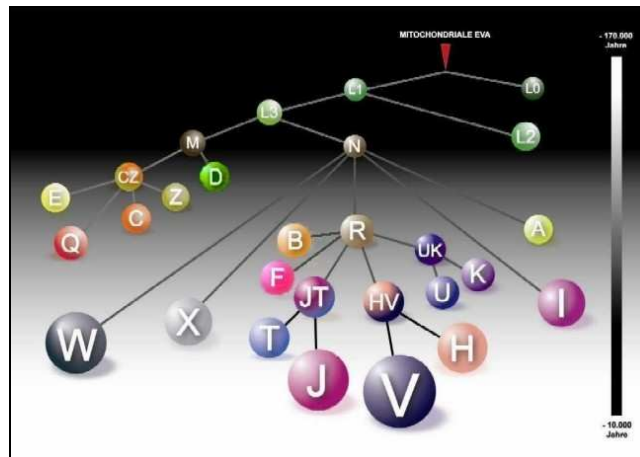


Abb. 5: Schematische Auftrennung der weltweit verbreiteten mitochondrialen Haplogruppen.

[aus: www.biologiezentrum.at/mpdh/mypersonaldnahistory.php, Stand: 6.6.09]

Anhand der genetischen Polymorphismen, die geographisch unterschiedlich verteilt sind, lässt sich auch die Besiedlungsgeschichte der einzelnen Kontinente rekonstruieren. Besonders gut sind diese für Europa und Amerika untersucht worden [Buselmaier & Tariverdian 2006].

Cavalli-Sforza, Menozzi und Piazza teilten in ihrer Publikation [1994] 26 europäische Populationen in sieben Gruppen ein. Die untersuchten, genetischen Polymorphismen dienen als Beweis für mehrere Migrationsbewegungen zu unterschiedlichen Zeiten. Zudem stimmen diese Ergebnisse auch gut mit den sprachlichen Gliederungen Europas überein. Eine Sonderstellung unter den genetischen Polymorphismen nehmen die Basken, die Saami, die Sarden und die Roma ein. Wie auch durch archäologische und linguistische Studien belegt, sonderten sich die Basken vor 18.000 Jahren ab und bildeten eine eigenständige Population. Die Roma kamen im 14. Jahrhundert aus dem nordwestlichen Indien und blieben, durch ihre eigene Kultur und damit auch genetisch, von Europa isoliert. Die genetische Eigenständigkeit der Saami und Sarden ergibt sich aus ihrem Inselstatus bzw. durch das Leben an der nördlichen Grenze Europas und der damit verbundenen relativen Isolation dieser beiden Bevölkerungsgruppen [Grupe et al. 2005].

Trotz der genetischen Polymorphismen kann davon ausgegangen werden, dass alle Wanderungsbewegungen nach Europa vom Mittleren Osten ausgingen und auch Rückwanderungen erfolgten [Richards et al. 2000, Achilli et al. 2004].

1.6 Molekulargenetische Untersuchungen an aDNA

Der Begriff aDNA stammt aus dem englischen “ancient DNA” (alte DNA) und ist die Bezeichnung für Reste von Erbgutmolekülen in toten Organismen. Dabei zerfällt die DNA zufällig in kleine Stücke durch die Anwesenheit von Nukleasen [Butler 2005].

Der Erkenntnisgewinn der aDNA Forschung ist in sehr verschiedenen Bereichen, z.B. für die Anthropologie, die Paläozoologie und -botanik aber auch für die Archäologie, von großer Bedeutung. So konnten Higuchi et al. [1984] erfolgreich DNA von dem ausgestorbenen Quagga extrahieren. Johnson et al. [1985] gelang es, DNA aus Mammuts zu gewinnen; während Rogers und Bendich [1985] DNA aus Pflanzen aus einem Herbarium nachweisen konnten. Große Fortschritte in der aDNA-Analyse wurden mit Hilfe der PCR-Technik erzielt, 1987 von Mullis und Faloona veröffentlicht. Auch in der Phylogenese hat die aDNA-Forschung wichtige Beiträge geliefert. So konnten Ovchinnikov et al. [2000] die Evolution des Homo sapiens genetisch darlegen und Krings et al. [1997] sowie Gutierrez et al. [2002] die Erforschung des Neanderthaler-Genoms veröffentlichen [Hummel 2003].

Analysen an aDNA und degradiert DNA werden häufig mit MiniSTR- und SNP-Methoden durchgeführt, da sie eine hohe Variabilität zwischen den Individuen aufweisen und auch in stark degradiert DNA aufgrund ihrer geringen Größe noch nachweisbar sind [Alonso et al. 2005]. Für eine matrilineare Abstammungslinie wird die Analyse der mtDNA eingesetzt [Giles et al. 1980]. In den meisten aDNA-Proben ist die Untersuchung der mtDNA oft erfolgreicher, da sie in der Zelle in wesentlich höherer Kopienzahl vorliegt und deshalb die Erhaltung wahrscheinlicher ist [Bär et al. 2000, Bender et al. 2000, Budowle (Pub.-Nr. 99-12)].

Bei günstigen Erhaltungsbedingungen ist auch eine Geschlechtsdiagnose mit Hilfe von aDNA möglich. Allerdings kann eine sichere Differenzierungsmöglichkeit beim Menschen eingeschränkt sein. Mit dem Nachweis von DNA-Fragmenten aus dem Y-Chromosom ist das Geschlecht eindeutig bestimmbar. Gelingt nur der Nachweis von Fragmenten aus dem X-Chromosom, kann nicht sicher auf ein weibliches Individuum geschlossen werden, da aufgrund der Erhaltung auch Fragmente aus dem Y-Chromosom nicht mehr nachweisbar sein können [Kloostermann & Kersbergen 2003, Hummel 2003].

Aufgrund von aDNA-Analysen liegen mittlerweile zahlreiche Veröffentlichungen zur Identifizierung bedeutender historischer Personen vor. Aus Überresten von Knochen, Haaren oder Kleidungsresten wird aDNA extrahiert. Anschließend erfolgt ein Abgleich mit Daten von noch lebenden putativen Verwandten. Bei einer Übereinstimmung gelten die Individuen

als identifiziert. Einige berühmte Beispiele sind die russische Zarenfamilie [Gill et al. 1994, Stoneking et al. 1995], Martin Bormann [Anslinger et al. 2001] und Jesse James [Stone et al. 2001]. Bei anderen Fällen wie z.B. Friedrich Schiller [www.gerichtsmedizin.at/friedrichschillercode.html, Stand: Juli 2009] und Kasper Hauser [Weichhold et al. 1998] konnten DNA-Untersuchungen vermutete Identifizierungen widerlegen. So ist sowohl der Schädel aus der Fürstengruft als auch der „Froriep-Schädel“ nicht von Friedrich Schiller und Kasper Hauser ist nicht der Sohn von der Großherzogin Stephanie von Baden.

1.6.1 Haltbarkeit von DNA

Das Alter einer Probe kann kein Indiz dafür liefern, wie hoch der DNA-Gehalt dieser Probe ist [Burger et al. 1999, Binladen et al. 2006]. Indes hat das Liegemilieu einen sehr starken Einfluss auf den Erhalt von DNA in historischen Proben. Generell kann gesagt werden, dass konstante, kühle Temperaturen, wie z.B. in Höhlen oder Permafrost, gut für den Erhalt der DNA sind. Daher konnte bis jetzt die älteste DNA aus Mammutknochen (50.000 Jahre alt) und Bisonknochen (65.000 Jahre alt) nachgewiesen werden, die im Permafrost gefunden wurden. Schätzungen zufolge ist es möglich, aus Permafrostknochen (wie aus dem Holozän und Pleistozän) noch 900-1.000 bp große DNA-Fragmente zu isolieren [Willerslev & Cooper 2005]. Dagegen bewirken heiße Temperaturen oder starke Temperaturschwankungen, beispielsweise in Wüsten, einen DNA-Verlust. Auch Feuchtigkeit fördert DNA-Abbau, indem sie Knochen und Zähne ermöglicht, organische Substanzen (wie zum Beispiel Harnstoff) aufzunehmen. Auch eine erhöhte Anzahl an Mikroorganismen im Liegemilieu hat eine zerstörende Wirkung auf die DNA [Burger et al. 1999, Hummel 2003].

Positiv für den DNA-Gehalt sind neutrale oder leicht basische pH-Werte der Umgebung, Trockenheit und mineralische Oberflächen. Diese, sowie ein hoher Salzgehalt, stabilisieren die DNA-Moleküle und sorgen für eine schnelle Austrocknung [Burger et al. 1999, Hummel 2003, Willerslev & Cooper 2005].

Durch diese vielen Einflussfaktoren ist eine zeitliche Eingrenzung für das Überdauern von aDNA schwierig. Trotzdem werden in der Literatur verschiedene Angaben dazu gemacht. So geben Willerslev und Cooper [2005] an, dass 100–500 bp lange Fragmente in temperierten Zonen bei etwa 10 °C ungefähr 10.000 Jahre nachweisbar sein sollten. Für Proben aus dem Permafrost schätzen sie die Grenze für eine mögliche Amplifikation von DNA auf 100.000 Jahre ab.

1.6.2 Abbau von Nukleinsäuren

Das Makromolekül DNA ist, wie viele andere chemische Verbindungen auch, nicht für immer existent. Der Zerfall der DNA wird durch Hydrolysen ausgelöst, die an unterschiedlichen Stellen mit unterschiedlicher Häufigkeit wirken. Hier kommt es zu einer Spaltung der Phosphodiesterbindungen oder zu einer Deaminierung.

Dennoch ist DNA wesentlich länger haltbar als RNA, da durch das Fehlen der 2'-OH-Gruppe im Zuckermolekül, die Hydrolyse schlechter die Phosphodiesterbindung spalten kann. Jedoch wird durch das Fehlen der 2'-OH-Gruppe die N-glykosidische Bindung zur jeweiligen Base gelockert und die hydrolytische Deaminierungsrate steigt an. Es wird die jeweilige Base abgetrennt und das Phosphat-Desoxyribose-Gerüst bleibt erhalten [Murken et al. 2006].

Dieses Phänomen kann auch zu falsch-positiven Ergebnissen führen, da die Deaminierung direkt auf die Sequenz wirkt [Höss et al. 1996]. Laut Binladen et al. [2006] ist eine Transition von Cytosin zu Thymin 30-50 mal wahrscheinlicher als eine Transition von Adenin zu Guanin. Auch konnte die Arbeitsgruppe keinen wesentlichen Unterschied in der Transitionsrate zwischen nukleärer und mitochondrialer DNA finden.

Weitere Degradationserscheinungen sind Alkylierung und die Maillard-Reaktion, die zu starken Verknüpfungen innerhalb und zwischen den verschiedenen DNA-Strängen führen und somit eine Amplifikation verhindern [Willerslev & Cooper 2005, Pääbo et al. 2004, Hummel 2003].

Eine relativ stabile Einheit in der nukleären DNA bilden die 190 bp langen Helix Untereinheiten. Deshalb sind besonders Fragmente unter 200 bp in aDNA-Extrakten noch nachweisbar, wohingegen längere Fragmente sehr selten amplifiziert werden können [Hummel 2003]. Eine Übersicht der biochemischen Prozesse beim DNA-Abbau ist in Tabelle 1 aufgelistet.

Tab. 1: Übersicht der häufig vorkommenden biochemischen DNA-Modifikationen.
[aus: Capelli et al. 2003, S. 60 mod.]

Biochemische Reaktion	DNA-Modifikation	Effekt auf die DNA-Analyse
Oxidation	verschiedene Basenmodifikationen	Einbau falscher Basen
		nicht mehr verlängerbarer DNA-Strang
Hydrolyse	Spaltung der Phosphodiesterbindungen	DNA-Fragmentierung
	Spaltung der N-glykosidischen Bindungen	Einbau falscher Basen
	Deaminierung	Einbau falscher Basen

2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung und Verbesserung molekulargenetischer Methoden für Proben mit alter und stark degradierter DNA.

Als Ausgangsmaterial für historische Proben dient Leichenbrand aus der vorrömischen Eisenzeit und der römischen Kaiserzeit in Schleswig-Holstein. Da in der vorangegangenen Diplomarbeit bereits aus den Gräberfeldern Husby, Schwissel und Gremersdorf in einigen Fällen DNA erfolgreich detektiert werden konnte, soll die vorliegende Arbeit mit anderen Gräberfeldern die Ergebnisse reproduzieren. Bei einer erfolgreichen Amplifikation von DNA aus den Leichenbränden sollen archäologische Fragestellungen an den Gräberfeldern genetisch beantwortet werden können. Diese betreffen meist die Verwandtschaftsverhältnisse, da diese nicht durch klassische, anthropologische Methoden nachzuweisen sind.

- (1) Sind die einzelnen Knochenfunde von Elitebestattungen in einem Gräberfeld einer oder mehreren Familien zugehörig?
- (2) Gehören benachbarte Gräberfelder mit unterschiedlichen Geschlechtern derselben Siedlungsgemeinschaft an?
- (3) Wie erfolgt die Verteilung der Familien auf einem Gräberfeld?
- (4) Sind die morphologisch für weiblich gehaltenen Gräber eines archäologischen „Männerfriedhofs“ nach einer DNA-Analyse weiblich oder männlich?

Um diese Fragen beantworten zu können, werden die Proben aus den Gräberfeldern Gremersdorf, Scharbeutz, Süderbrarup, Norderbrarup und Sörup II auf das Vorhandensein von amplifizierbarer DNA getestet.

Für eine bessere Ausbeute an alter und stark degradierter DNA aus den Proben werden folgende Ziele verfolgt.

- (1) Etablierung einer SNP-Analyse zur Bestimmung mitochondrialer Haplogruppen
- (2) Effektive Entfernung / Vermeidung von Kontaminationen
- (3) Modifikation der Extraktionsmethode speziell für Knochenproben mit wenig DNA.

Des Weiteren werden nicht nur Leichenbrandproben untersucht, sondern auch Knochenproben von Brandleichen und stark fäulnisveränderten Leichen. Die Knochenproben der Brandleichen dienen als Vergleich für die Leichenbrandproben. Damit können Fragen

beantwortet werden, ob es (1) möglich ist, DNA zu gewinnen und wenn ja (2) bis zu welchem Verbrennungsgrad authentische DNA aus hitzeveränderten Knochen amplifizierbar ist.

Die stark fäulnisveränderten Rippen als auch Organproben dienen einer Vergleichsanalyse. Dabei soll herausgefunden werden, welche Gewebeprobe den größten Amplifikationserfolg liefert. Da die Extraktion von DNA aus Knochen sehr aufwendig im Vergleich zur DNA-Extraktion aus Geweben ist, soll überprüft werden, ob die Qualität der DNA aus Rippen besser sei, um diesen Aufwand zu rechtfertigen.

Damit geht diese Arbeit auch einer forensischen Fragestellung nach: Welche Gewebe und Methoden sind bei Leichen mit starken postmortalen Veränderungen oder Brandeinwirkung für eine schnelle Identifizierung am besten geeignet?

3 Probenmaterial

3.1 Material für die Etablierung der SNP-PCRs

Für die Überprüfung der Funktionsfähigkeit der Primer wurden von Frau PD Dr. M. Poetsch (Institut für Rechtsmedizin Essen) 35 Proben und von Frau PD Dr. J. Edelmann (Institut für Rechtsmedizin Leipzig) zwölf Proben zur Verfügung gestellt. Von allen 47 Proben waren die Haplogruppen bekannt, sodass die neu entwickelten PCRs damit überprüft werden konnten. Des Weiteren wurden 145 Proben von 36 DNA-Fällen (Zeitraum 2006-2008) ausgewählt, die schlechte Ergebnisse in der STR-Analyse zeigten. Pro Fall war auch immer eine weitere Probe mit guten STR-Ergebnissen existent, um die Profile miteinander vergleichen zu können. Diese Fälle stammen alle aus dem DNA-Routinelabor des Instituts für Rechtsmedizin Kiel und waren zum Zeitpunkt der SNP-Analyse bereits abgeschlossen. In allen Fällen stand noch genügend DNA zur Verfügung, um die SNP-Analyse sowie eine Screening-PCR durchführen zu können. Die DNA-Proben wurden im Gefrierschrank bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und im Kühlschrank bei $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, bis sie Anfang 2009 nochmals analysiert wurden.

Tab. 2: Übersicht der Proben mit schlechten STR-Profilen.

Spurenmaterial	Anzahl der Proben
Hand	4
Rasierer	6
Zahnbürste	19
Kamm	10
Tempotaschentuch	2
Gewebe im Paraffinblock	7
Tupfer mit Blut	6
Knochen / Zahn	19
Postkarte	2
Zigarettenkippen	2
Haare	12
Placenta / Abortgewebe	6
Hundekot	6
Hemd	4
Gehirn in Formalin eingelegt	2

In die Analyse gingen 49 Proben aus 13 DNA-Fällen aus dem Jahr 2008, 53 Proben aus 14 DNA-Fällen aus dem Jahr 2007 und 43 Proben aus neun DNA-Fällen aus dem Jahr 2006 ein. Untersucht wurden neun Organe, 13 Blutkarten und 16 Abstriche, die als Vergleichsmaterial dienten und gute STR-Profile lieferten. Als Spurenmaterial kamen die in Tabelle 2 genannten Proben zum Einsatz.

Alle diese Vergleichsproben wiesen eine geringe Menge an DNA auf und bereiteten Schwierigkeiten bei der STR-Analyse mit kommerziellen Kits. Alle STR-Profile stammten aus den Routinefällen und wurden nicht nochmals für diese Arbeit analysiert.

3.2 Material für Dekontaminationsversuche

Als Ausgangsmaterial für die Dekontaminationsversuche dienten Leichenbrandknochen aus den Urnengräberfeldern Husby, Schwissel und Gremersdorf. Husby wurde vom Ende der vorrömischen Eisenzeit bis zur römischen Kaiserzeit (0-375 n. Chr.) belegt. Die archäologischen Befunde sprechen für eine Belegung hauptsächlich mit Männern. Das Gräberfeld Schwissel stammt aus der vorrömischen Eisenzeit (500-0 v. Chr) und wurde überwiegend für Frauen genutzt. Die Urnen von beiden Gräberfeldern, ausgegraben in den fünfziger Jahren, lagerten nach der archäologischen und anthropologischen Bearbeitung im Schloss Gottorf. Das Urnengräberfeld Gremersdorf wird unter 3.4.1 beschrieben. Zusätzlich kamen Rippenknochen von einem Seehund zur Anwendung.

In Vorversuchen wurde von jedem Knochen ein Stück auf das Vorhandensein von authentischer DNA und mitextrahierten PCR-Inhibitoren hin getestet. In die Kontaminationsversuche kamen nur Knochen zum Einsatz, die weder Inhibitoren noch authentische DNA aufwiesen.

Die Austestung erfolgte mittels drei verschiedener Kontaminationsarten:

- Gruppe I: Zwei Personen reiben die Knochen zwischen ihren bloßen Händen für fünf Minuten. Zusätzlich husten die Personen auf die Knochen.
- Gruppe II: Auf die Knochen werden 20 µl Speichel aufgetragen.
- Gruppe III: Die Knochen werden mit 20 µl einer 200 ng DNA-Lösung beträufelt.

Die Knochen wurden getrocknet; etwa die Hälfte davon eigneten sich als Kontrolle für eine erfolgreiche Kontamination und wurden nicht vor der Extraktion gereinigt. Die andere Hälfte durchlief eine mechanische Reinigungsprozedur mittels Zahnbürste unter fließendem Wasser. Anschließend wurden die Knochen mit vergälltem Ethanol (vergällt mit 1 % Petroläther) und

doppelt destillierten Wasser gespült, dann kurz bei 50 °C getrocknet. Zum Schluss durchliefen die Knochen von jeder Seite eine zehnminütige UV-Licht-Bestrahlung.

Insgesamt gingen 64 Knochenproben in die Versuchsreihe ein. Zur Gruppe I (Handkontakt) gehörten 23 Knochen, wovon zwölf gereinigt wurden. In Gruppe II (Speichel) wurden 17 Proben kontaminiert und davon elf gereinigt. Für die Gruppe III (DNA) wurden 24 Knochen kontaminiert und 15 gereinigt.

Da sich die Dekontaminationstechnik während der Arbeit änderte, ist auch diese vorher getestet worden. Als Spureenträger kamen Gehörknöchelchen zum Einsatz. Diese sind gekennzeichnet durch eine relativ raue Oberfläche und viele kleine Ecken, an der sich kontaminierende DNA gut festsetzen kann. Von den drei Gehörknöchelchen wurde der Amboss ausgewählt. Insgesamt wurden sechs Ambosse von drei verschiedenen Frauenleichen untersucht. Es wurde darauf geachtet, dass die Verstorbenen keine Anzeichen einer Fäulnis aufwiesen. Ein rechter Amboss war nicht mehr vollständig existent. Zusätzlich wurde die DNA der Frauen aus den routinemäßig verwendeten Blutkarten extrahiert und in einer STR-Analyse amplifiziert. Als kontaminierende Substanz kam das Blut eines männlichen Mitarbeiters zum Einsatz, das sich in seinen STR-Merkmalen am stärksten von den drei Frauen unterschied. Somit konnte über den Nachweis der autosomalen STRs und besonders der Y-STRs, eine Kontamination nachgewiesen werden.

Die Kontamination erfolgte folgendermaßen: Alle Knochen wurden einzeln in 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben und mit 200 µl Blut bedeckt. Anschließend wurden die Proben über Nacht bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden jeweils die linken Ambosse aus dem Blut entnommen und sofort für zehn Minuten in Bleiche überführt. Dann wurden sie dreimal mit doppelt destillierten Wasser gespült und im Brutschrank bei 37 °C getrocknet. Dagegen wurden die rechten Ambosse direkt nach der Entnahme aus dem Blut im Brutschrank (über Nacht) getrocknet. Am nächsten Tag wurden sie ebenfalls für zehn Minuten in Bleiche geschwenkt und danach dreimal mit doppelt destillierten Wasser gespült und getrocknet.

3.3 Kriterien für die Auswahl der Urnengräberfelder

Für die molekulargenetischen Analysen der Leichenbrände standen fünf Gräberfelder zur Verfügung – Gremersdorf, Scharbeutz, Süderbrarup, Norderbrarup und Sörup II (siehe Abbildung 6). Es handelt sich dabei um Urnenfriedhöfe, die in der vorrömischen Eisenzeit und in der römischen Kaiserzeit belegt wurden. Die Auswahl der Gräberfelder begründete sich folgendermaßen:

- Gremersdorf, um die positiven Ergebnisse aus der vorangegangenen Diplomarbeit zu reproduzieren. Außerdem fand die Öffnung der meisten, ausgewählten Urnen speziell für die Probenentnahme zur Diplomarbeit statt. Soweit bekannt, wurden die Leichenbrände anschließend im Archiv gelagert, so dass eine Kontamination mit moderner DNA gering sein dürfte.
- Scharbeutz, weil die Urnen zum Teil noch nicht geöffnet waren und so eine Kontaminationsquelle ausgeschlossen werden konnte. Zudem gab es in Scharbeutz Mehrfachbestattungen, woraus sich die Frage nach Familienzusammengehörigkeiten stellen ließ.
- Süderbrarup, weil einige Gräber anthropologisch als sicher weiblich bestimmt worden waren, obwohl es sich um einen Männerfriedhof handelt.
- Norderbrarup hat nur eine geringe Anzahl an Urnen. Wenn sich die Proben für molekulargenetische Untersuchungen eignen, kann anhand einer flächendeckenden Untersuchung herausgefunden werden, wie sich auf diesem Gräberfeld die Familien verteilen.
- Sörup II ist ein beigabenreicher Frauenfriedhof mit einigen - ausnehmend reich - ausgestatteten Gräbern. Dieses Gräberfeld soll zum Nachweis eventueller Familienzusammengehörigkeiten bei den Elitebestattungen dienen.



Abb. 6: Karte von Schleswig-Holstein mit der Lage der bearbeiteten Urnengräberfelder.

3.4 Beschreibung der Gräberfelder

3.4.1 Gremersdorf

Das Urnengräberfeld Gremersdorf wurde bei Kiesabbauarbeiten 2000/01 entdeckt. Es handelt sich dabei etwa um 200 Urnen, die aus dem groben, wasserundurchlässigen Boden geborgen wurden. Sie befanden sich in einem guten Erhaltungszustand. Die archäologische Bearbeitung ist noch nicht so weit fortgeschritten, um an dieser Stelle Genaueres über das Urnengräberfeld aussagen zu können. Allerdings fand eine Datierung statt, die darauf schließen lässt, dass der Friedhof von 200 vor Chr. bis zu Christi Geburt belegt worden war und somit der vorrömischen Eisenzeit zugerechnet werden kann.

3.4.2 Scharbeutz

Das Urnengräberfeld Scharbeutz wurde bei Erschließungsarbeiten eines Gewerbegebiets im September 2003 entdeckt. Wegen fortschreitender Bauarbeiten wurde deshalb eine Notgrabung eingeleitet. Dabei konnten 75 Fundstellen auf einer 200 m² großen Fläche festgestellt werden, wobei nicht in allen Fällen Urnen vorhanden waren. Durch die folgenden Bauarbeiten wurden weitere Urnen in Steinpackungen gefunden. Deshalb kam es zu einer zusätzlichen Grabung von Juli bis September 2004 auf dem erschlossenen Gewerbegebiet. In der erkundeten Fläche konnten ca. 150 archäologische Befunde, überwiegend Urnenbestattungen sowie vereinzelte Brandgruben, geborgen werden [Krause-Kyora 2007].

In den meisten Fällen umgaben Steinummantelungen die Urnen. Trotzdem wurden viele Urnen im Laufe der Jahrhunderte zerdrückt oder vom Pflug beschädigt. Soweit es dem ausgrabenden Personal möglich war, wurden die Urnen „en bloc“ geborgen [Krause-Kyora 2007].

Aufgrund der Gefäßformen der Urnen kann das Gräberfeld in den Übergang von der älteren in die jüngere, vorrömische Eisenzeit datiert werden. Eine zeitliche Einordnung anhand von Beigaben war durch die geringe Fundmenge nicht möglich [Krause-Kyora 2007].

In diesem Urnengräberfeld sind Mehrfachbestattungen (Befunde 154, 156, 171, 172), Nachbestattungen (Befunde 173, 150) und Exhumierungen (Befund 245) nachweisbar. Diese Befunde sprechen dafür, dass die Gräber einst sichtbar waren. Auch wird von den Archäologen angenommen, dass die Mehr- und Nachbestattungen auf bestimmte Intentionen, wie z.B. Familiengräber, hindeuten [Krause-Kyora 2007].

3.4.3 Süderbrarup

Erste Hinweise auf ein Urnengräberfeld am Marktplatz von Süderbrarup wurden 1913 bekannt, nachdem schon Anfang des 20. Jh. kleinere Grabungen auf benachbarten Grundstücken durchgeführt wurden. In den Jahren 1939-1941 und 1962 erfolgte dann eine planmäßige Ausgrabung, die offensichtlich das komplette Urnenfeld erfasste. Datiert ist dieses Gräberfeld vom ersten bis in das fünfte (gegebenenfalls sogar sechste) Jahrhundert und gehört somit in die römische Kaiserzeit und Völkerwanderungszeit in Angeln. Der Erhaltungszustand der Urnen ist sehr schlecht, da sie nur eine geringe Deponierungstiefe aufwiesen und der Platz traditionsgemäß schon sehr lange als Markt fungierte [Wahl 1988, Bantelmann 1988].

Insgesamt kamen dabei 1.234 -meistens beigabenarme- Bestattungen zum Vorschein. 763 Leichenbrände, die 780 Individuen repräsentieren (17 Doppelbestattungen), gelangten zur anthropologischen Untersuchung. Da es sich bei dem Leichenbrand vorwiegend um Brandreste aus zerstörten Urnen handelte, wurden die Leichenbrände bei der anthropologischen Bearbeitung mit Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet. Eine Auflistung der anthropologischen Befunde der Leichenbrände, die in dieser Arbeit untersucht wurden, sind in Tabelle A2 im Anhang zu finden [Wahl 1988].

Die Färbung der Knochenfragmente aus Süderbrarup waren durchweg weißlich bis hellbeigefärbend, bisweilen noch grau oder bräunlich. Selbst die Bruchflächen der Kompaktknochen waren meistens weiß, seltener grau und nur gelegentlich schwarz. Da in Süderbrarup kaum schwarze Knochen zu finden waren, ist davon auszugehen, dass die Verbrennungstechnik gut beherrscht wurde und genügend Brennmaterial zur Verfügung stand. Durch die Beigaben aus Eisen und Bronze waren auf den Knochen teilweise Rotbraun- und Grünverfärbungen sichtbar. Anhand der Beurteilung der Färbung der Knochen sowie der Beschaffenheit der Befunde lies sich eine Verbrennungstemperatur von ca. 850 °C rekonstruieren. Damit sind die einzelnen Verbrennungserscheinungen mit heutigen Leichenbränden aus Krematorien vergleichbar [Wahl 1988].

Die anthropologische Untersuchung zeigte zusammenfassend folgende Ergebnisse: Die Fragmentierung des Leichenbrandes konnte im gesamten Urnenfeld als klein bis kleinst, mit einer durchschnittlichen Größe von 23 mm, zusammengefasst werden. Der Anteil an Kindern und Jugendlichen betrug ca. 25 %. Das Durchschnittsalter erwachsener Männer lag bei 41,8 Jahren, das der Frauen bei 37,9 Jahren, wobei ein deutlicher Aufwärtstrend im Laufe der Jahrhunderte festzustellen war. Von den insgesamt 596 Erwachsenen wurden 305 als männlich bestimmt und 63 als weiblich. Der Rest konnte nicht eindeutig zugeordnet werden.

Daher wurde dieses Gräberfeld, zumindest von der Anlage her, als Männerfriedhof bezeichnet. Die Körperhöhe lag bei den Männern zwischen 165,4 cm und 182,0 cm und bei den Frauen zwischen 152,6 cm und 169,0 cm. In 15 % aller Leichenbände konnten auch Tierknochen gefunden werden [Wahl 1988].

3.4.4 Norderbrarup

Das Urnengräberfeld Norderbrarup wurde Anfang des 21. Jahrhunderts ausgegraben und ist weder archäologisch noch anthropologisch bearbeitet. Eine erste Datierung geht von einer Belegung im ersten Jahrhundert vor Christus aus. Insgesamt wurden ca. 48 Urnen geborgen [Gebühr, persönliche Korrespondenz]. Die fünf, in dieser Arbeit untersuchten, Urnen wurden bereits Ende 2005 in der Werkstatt des Schloss Gottorfs geöffnet. Damit kann eine Kontamination nicht ausgeschlossen werden.

3.4.5 Sörup II

Sörup II ist ein, während der späten vorrömischen Eisenzeit und der älteren Kaiserzeit genutzter, Urnenfriedhof. Erste Urnen wurden 1967 beim Ausschachten einer Kellergrube in einem bereits erschlossenen Neubaugebiet entdeckt. Der Grundstückseigentümer zerstörte die Urnen aus Angst vor einem Baustop und entsorgte sie in der Aushubschüttung. Der Vorgang wurde dem Landesamt für Vor- und Frühgeschichte gemeldet und es erfolgte eine Sondierungsgrabung. Diese erbrachte 14 Urnen sowie mehrere Gruben und Brandstellen. Weitere Grabungen fanden im November 1967 und im Sommer 1968 statt. Insgesamt konnten dabei 181 Grabstätten erfasst werden [Lagler 1989].

Auf diesem Friedhof ließen sich nur Brandbestattungen in Urnengräbern nachweisen. Die meisten Urnen hatten keinen Steinschutz und standen auf einer Lehmschicht oder waren in diese eingesenkt. Die Leichenbrände waren zu zwei Dritteln mit Beigaben versehen [Lagler 1989].

Anthropologisch bearbeitet wurden (stichprobenartig) 33 ausgewählte Leichenbrände. Davon waren elf als mögliche Kinderbestattungen einzuordnen. Bei 18 Leichenbränden war eine Geschlechtsdiagnose möglich, die 15 Leichenbrände als weiblich einstufte. Somit ist von einem Frauenfriedhof auszugehen, der aber auch in einem geringen Teil mit Männern belegt worden war [Lagler 1989].

3.5 Knochenmaterial von historischen Leichenbränden

Von den fünf untersuchten Gräberfeldern wurden 40 Urnen ausgewählt und 516 Knochenproben (darunter vier Zähne) molekulargenetisch analysiert. Aus Tabelle 3 geht hervor, wie sich die Anzahl der Proben auf die einzelnen Gräberfelder verteilt. In Tabelle A1 im Anhang erfolgt eine Auflistung aller untersuchten Urnen.

Tab. 3: Übersicht über die Anzahl der analysierten Proben.

Gräberfeld	Anzahl der Urnen	Anzahl der Proben	davon Zähne
Gremersdorf	7	108	
Süderbrarup	9	127	
Sörup II	5	71	
Norderbrarup	5	47	
Scharbeutz	14	163	6
insgesamt	40	516	6

Alle Urnen sind zum Zeitpunkt der Entnahme im Landesmuseum Schleswig Holstein, Schloss Gottorf, aufbewahrt. Die Urnen aus Süderbrarup und Sörup II waren alle bereits geöffnet und der Leichenbrand gewaschen und anthropologisch untersucht. Da die Bearbeitung dieser Leichenbrände schon viele Jahre zurückliegt, kann nicht mehr rekonstruiert werden, welcher Personenkreis mit den Proben Kontakt hatte. Daher sind diese Proben -sehr wahrscheinlich- mit moderner DNA kontaminiert. Auch die Leichenbrände von Norderbrarup wurden bereits 2005 aus den Urnen geborgen und gewaschen. Diese sind wahrscheinlich ebenfalls kontaminiert. Trotz der kurzen Zeit von der Öffnung der Urne bis zur Probenentnahme kann nicht mehr rekonstruiert werden, wer mit den Proben Kontakt hatte, da auch Praktikanten an diesen Urnen mitgearbeitet hatten. Die Urnen aus Gremersdorf wurden während der vorangegangenen Diplomarbeit geöffnet und dann nur gelagert, so dass in diesen Fällen die Gefahr einer Kontamination als gering einzustufen ist. Die Urnen aus Scharbeutz waren noch in den meisten Fällen „en bloc“ und wurden erst im Rahmen der Doktorarbeit geöffnet (siehe Abbildung 7). In den anderen Fällen sind sie im Rahmen einer Praktikumsarbeit geöffnet worden. Allerdings bestand die Hauptaufgabe in der Rekonstruktion der Urnen. Es ist davon auszugehen, dass der Leichenbrand nur entnommen, gewaschen und nicht weiter bearbeitet worden ist. Mit großer Wahrscheinlichkeit sind diese Proben deshalb ebenfalls kontaminiert.



Abb. 7: Zustand der Urnen und des Leichenbrandes am Beispiel der Urne 248 aus Scharbeutz.

1: Urne mit Gipsbinden umwickelt, 2: Urne mit sichtbarer Keramik und Leichenbrand, 3: geborgener Leichenbrand.

Bei der Öffnung der noch verschlossenen Urnen, die in der Werkstatt im Schloss Gottorf erfolgte, war das Tragen von Handschuhen Pflicht. Diese wurden nach jeder Urnenbearbeitung gewechselt, um eine direkte Übertragung von moderner DNA auf den Leichenbrand auszuschließen. Weitere Vorkehrungen konnten vor Ort nicht getroffen werden. Die Entfernung der Gipsbinden erfolgte mit einer Schere; die lose aufliegende Keramik wurde abgenommen und separat aufbewahrt. Anschließend wurde der Leichenbrand in ein Sieb verbracht und so von der Erde getrennt. Es wurden größere Fragmente herausgesammelt, damit eine weitere Fragmentierung verhindert werden konnte. Direkt im Anschluss erfolgte die Probenentnahme.

Generell wurde bei der Probenentnahme darauf geachtet, vorrangig kompakte Knochenstücke auszuwählen, die graue oder schwarze Stellen aufwiesen.

Insgesamt erfolgte eine dreimalige Probenentnahme. Im Sommer 2006 wurden Urnen aus Gremersdorf, Süderbrarup und Sörup II beprobt. Im Sommer 2007 erfolgte eine nochmalige Beprobung der gleichen Urnen aus den drei Gräberfeldern sowie erstmalig Norderbrarup. Im Sommer 2008 folgte dann eine Beprobung der Urnen aus Scharbeutz.

3.6 Knochenmaterial von Brandleichen

Von ausgesuchten Obduktionen der Jahre 2006 bis 2008 am Institut für Rechtsmedizin Kiel wurden 13 Brandleichen ausgewählt, die unterschiedliche Stadien der Verbrennung aufwiesen. All diese Personen starben unmittelbar durch das Feuer. Die Bezeichnung Brandleiche wird genutzt, wenn die Personen entweder aufgrund ihrer thermisch induzierten Verletzungen, wie z.B. Verbrennung der Haut, oder durch die sogenannte Rauch-Inhalation, also durch eine Kohlenstoffmonoxidvergiftung, sterben [DiMaio & DiMaio 1993]. Andere Autoren nutzen den Begriff Brandleiche für Verstorbene, die Zeichen einer Hitzeeinwirkung zeigen, unabhängig davon, ob diese zu Lebzeiten oder postmortal entstanden sind [Janssen 1977] oder sie definieren Brandleichen als Leichnam mit postmortaler Brandzehrung [Hunger et al. 1993].

Die untersuchten 13 Brandleichen wiesen alle verkohlte oder verbrannte Knochen, große Hitzeschädigungen der Organe oder andere Anzeichen einer viergradigen Verbrennung auf. Teilweise lag nur noch ein Brandtorso vor. Weitere Informationen über die einzelnen Fälle sind der Tabelle 4 zu entnehmen.

Tab. 4: Auflistung der untersuchten Brandleichen, die in dieser Studie berücksichtigt wurden.

Gezeigt sind wichtige Befunde aus dem Sektionsprotokoll im Bezug auf den Verbrennungsgrad, Brandort und Alter der Leichen. ♀: Frau, ♂: Mann

Fall	Sex	Alter (in Jahren)	Grad der Verbrennung	Brandort
1	♀	77	Hautverkohlung und Hautaufplatzung, lederartige Verfestigung verbleibender Hautareale, einige Knochen und Schädel liegen frei, verkochte Muskulatur in der Tiefe,	Hausbrand, vermutlich Explosion
2	♂	56	Körperoberfläche verkohlt, linksseitiger Verlust von Haut, Muskeln und Rippen, Kopfbereich stark verkohlt, Schädeldach ist aufgeplatzt, Vorderarmknochen sind freigelegt und verkohlt	Hausbrand
3	♂	64	Hautrötungen, Vertrocknungen, Oberhautablösung, lederartige Verfestigung und Hautaufplatzungen, an Schädel und Armen freigelegte Muskulatur und Knochen, Verlust der Gesichtsweichteile	Hausbrand
4	♂	19	Fechterstellung, hochgradige Verkohlung der Körperoberfläche, Hautaufplatzungen, Schädelknochen liegen teilweise frei und sind verkohlt, Verlust der Gesichtsweichteile und Teile der Hände	Autounfall
5	♀	44	Stark hitzezerstörter Brandtorso bestehend aus Schädel, Rumpf, Becken und stummelartigen Resten der Extremitäten, separate Anteile der Füße sowie kleinerer Knochenreste, Schädel geborsten mit karbonisierten Knochen, Torso durch Brand geöffnet mit verkohlten Eingeweiden	Autobrand
6	♂	81	Fast vollständiger Verlust der Oberhaut, Muskulatur liegt teilweise offen, Kopfschwarte großflächig verbrannt, Schädelknochen liegen offen	Hausbrand
7	♀	41	Hochgradige Verkohlung nahezu der gesamten Körperoberfläche, großflächiger Verlust der Haut, verkohlte Muskulatur liegt frei, Schädeldeckensprengung, separate Anteile von verkohlten Knochen, Hitzefrakturen	Autobrand

8	♂	48	Fechterstellung, aufgeplatzte Hautabschnitte, Oberhautablösung, Fußknochen sind verkohlt, Verkohlung der Schädelknochen	Hausbrand
9	♂	54	Hochgradige Verkohlung der Vorderseite, Verkohlung der Weichgewebe, Verlust der Gesichtsteile, geringe Hitzeschäden der unteren Extremitäten und des Rückens,	Autobrand
10	♀	46	Lederartige Verfestigung der Haut im Kopf- und Oberkörperbereich, teilweise freigelegte Knochen, Oberhautablösung, Sprengung des linken Kniegelenks	Brand in Gartenlaube
11	♂	50	Brandtorso bestehend aus verkohlter Wirbelsäule mit Rippenfragmenten, Becken, Oberschenkel in Teilen, alle Knochen verkohlt oder verbrannt	Hausbrand
12	♂	42	Fechterstellung, Kopfhaut verkohlt, Schädelknochen liegen teilweise frei, Oberhautablösung, Verkohlung und Vertrocknungen im Rücken- und Gesäßbereich, Totenflecken noch sichtbar,	Hausbrand
13	♂	63	Brandtorso: Verlust von Knochen, Haut und Organen, Knochen sind verkohlt oder verbrannt bzw. zu Asche zerfallen, Schädel und Gesichtskelett größtenteils zu Verlust gegangen	Autobrand

Insgesamt wurden von den 13 Brandleichen 71 Knochenfragmente untersucht. Dabei wurde kompaktes Knochenmaterial gegenüber spongiösen bevorzugt, da die DNA-Qualität und – Quantität in diesen besser nachweisbar ist [Alonso et al. 2001]. Anschließend erfolgte eine Einteilung der Proben in fünf Gruppen, abhängig von ihrem Verbrennungsgrad: I – kaum verbrannt, II – halbverbrannt, III – schwarz verbrannt, IV – blau-grau verbrannt, V – blau-grau-weiß verbrannt. In Abbildung 8 sind typische Beispiele für die Morphologie der einzelnen Gruppen dargestellt und in Tabelle 5 sind die ausgewählten Knochen der einzelnen Fälle mit ihrem Verbrennungsgrad ersichtlich.

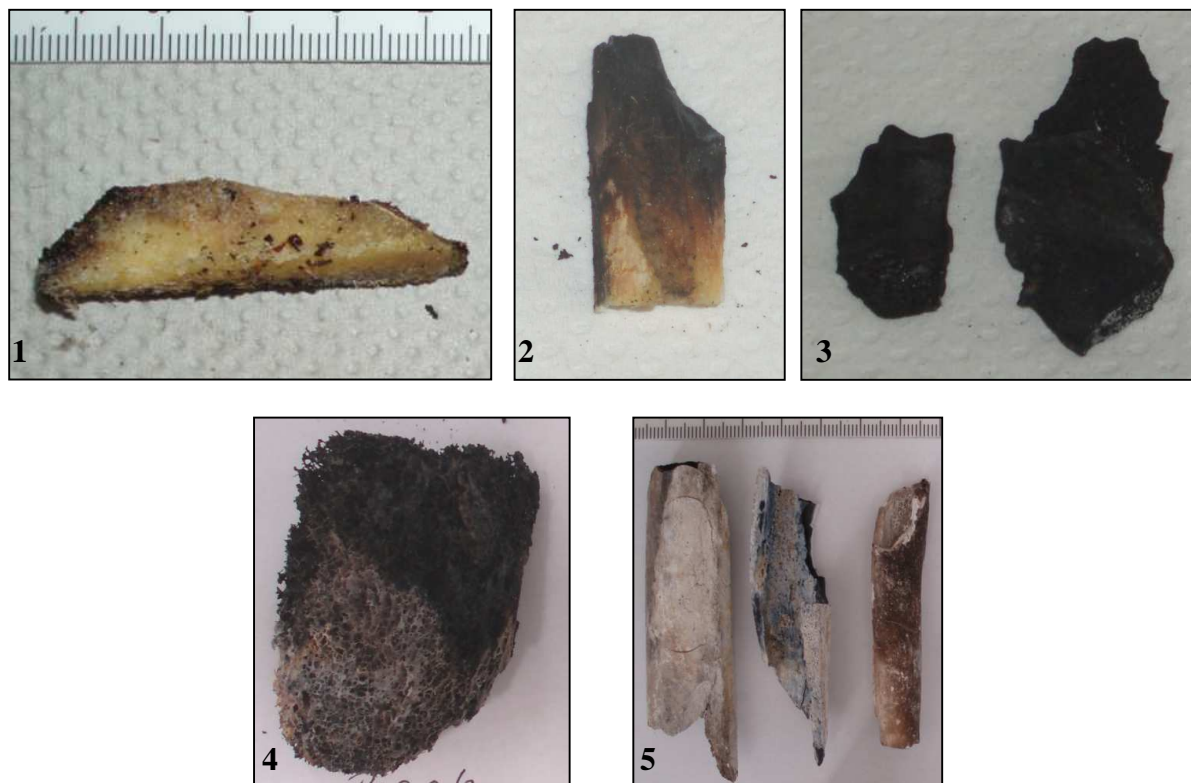


Abb. 8: Typische Morphologie der einzelnen Gruppen.

1: kaum verbrannt, 2: halb verbrannt, 3: schwarz verbrannt, 4: blau-grau verbrannt, 5: blau-grau-weiß verbrannt.

Tab. 5: Übersicht der untersuchten Knochenfragmente und ihre Einteilung in die fünf Verbrennungsstufen.

In der letzten Zeile ist die Gesamtanzahl der analysierten Knochen pro Gruppe angegeben.

Fall	kaum verbrannt	halb verbrannt	schwarz verbrannt	blau-grau verbrannt	blau-grau-weiß verbrannt
1	Humerus	Zahn Tibia	Schädel	-	-
2	Femur Rippe	Schädel	Tibia	-	-
3	Vorderarm links Vorderarm rechts	Vorderarm links Vorderarm rechts	2x Vorderarm links Vorderarm rechts	-	-
4	-	Vorderarm links Vorderarm rechts	Schädel Vorderarm	-	-
5	2x Wirbelscheiben	Femur Wirbelkörper	Femur rechts Humeruskopf Fibula Zahnwurzel	Schädel Femur Vorderarm	Schädel Becken Schulter
6	-	Schädel Femur Diaphyse	Tibia links Femur Condyle	Femur Condyle	-
7	-	-	Vorderarm rechts Femur Condyle li. Tibia rechts Tibia links Schädel	Vorderarm links	-
8	-	2x Tibia	Tibia 3x Fußzehe	-	-
9	-	Schädel Finger	-	-	-
10	Femur	-	2x Femur	-	-
11	Femur	Becken Tibia	-	-	-
12	-	-	Zeigefinger Mittelfinger	-	-
13	-	Humerus	-	Wirbelkörper Becken Femur Rippe Schädel	4x Langknochen Kniescheibe
total	9	18	26	10	8

3.7 Knochenmaterial von stark fäulnisveränderten Leichen

In den Jahren 2005 bis 2007 wurden 32 Leichen mit unterschiedlich starken Fäulnisveränderungen, welche im Institut für Rechtsmedizin Kiel obduziert wurden, für diese Studie ausgewählt. Da routinemäßig während einer Sektion immer verschiedene Organe und ein Stück Rippe asserviert werden, konnten auch die Identifizierungen aus dem Jahr 2005 mit berücksichtigt werden. Alle 32 Personen wurden mittels DNA-Analyse der Gewebe identifiziert, so dass die STR-Profile aus der Routine übernommen werden konnten. Alle Rippenstücke wurden im Rahmen der Dissertation bearbeitet. Sie sollen als Vergleichsmaterial in dieser Studie eingesetzt werden.

Die Einteilung der Fäulnisgrade erfolgt in höchstgradig, hochgradig, fortgeschritten und beginnend. Unter beginnender Fäulnis werden Leichen mit einer Grünfärbung des Bauchraums, teilweise auch des Kopf- und Schulterbereiches sowie mit Erweichung der Augäpfel zusammengefasst. Leichen mit fortgeschrittener Fäulnis zeigen ein durchschlagendes Venennetz, eine dunkelgrüne Verfärbung des gesamten Bauchraumes, Austreten von Fäulnisflüssigkeit und Gasblähungen sowie teilweise Madenbefall. Bei hochgradig fäulnisveränderten Leichen ist die gesamte Körperoberfläche grün oder rotbraun verfärbt. Des Weiteren ist der gesamte Körper gasgebläht und die Fäulnisblasen sind teilweise aufgeplatzt. Auch erste Mumifizierungserscheinungen und Maden treten häufig auf. Bei den höchstgradig fäulnisveränderten Leichen finden sich Verwesungserscheinungen sowie häufig Teilskelettierungen und Madenbefall. Als Kontrollgruppe dienten zwei nicht fäulnisveränderte Leichen. Weitere Einzelheiten sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

Von den insgesamt 32 Leichen konnten 121 Proben in die Analyse einbezogen werden. Diese setzen sich aus 20 Rippenstücke, 30 Aortaproben, 29 Nierenproben, 17 Leberproben und 25 Muskelproben zusammen. Unter den Rippenstücken ist auch ein Knochen eines Fußgliedes aus Fall 24 mit berücksichtigt worden, da nur ein Fuß vorlag.

Tab. 6: Übersicht der untersuchten Leichen mit ihrem zugeordneten Fäulnisgrad.

pmi: postmortales Intervall bis zum Auffinden der Leiche, n.b. nicht bekannt, ♀: Frau, ♂: Mann

Fall	Sex	Alter in Jahren	pmi	Fäulnisgrad	Fundort
1	♀	83	Stunden	keine Fäulnis	Klinik
2	♀	97	Stunden	keine Fäulnis	Klinik
3	♂	55	mehrere Tage	leichte Fäulnisveränderung mit Grünverfärbung	Wohnung
4	♀	neonatal	einige Tage	leichte Fäulnisveränderung mit Grünverfärbung	n.b.
5	♂	57	1,5 Wochen	fortgeschrittene Fäulnis	Wohnung
6	♂	57	3 Tage	fortgeschrittene Fäulnis	Wohnung
7	♀	59	3 Wochen	fortgeschrittene Fäulnis	Wohnung
8	♀	neonatal	3 Wochen	fortgeschrittene Fäulnis	Wohnung, in Folie gewickelt
9	♂	58	n.b.	fortgeschrittene Fäulnis	Wohnung
10	♂	61	1 Woche	fortgeschrittene Fäulnis	Wohnung
11	♂	44	1 Woche	fortgeschrittene Fäulnis mit Madenbefall	
12	♂	34	2 Wochen	fortgeschrittene Fäulnis mit Madenbefall	Wohnung
13	♂	41	3 Monate	fortgeschrittene Fettwachsbildung	Wasser
14	♂	36	1 Woche	hochgradige Fäulnis mit Madenbefall	Wohnung
15	♂	40	4-5 Wochen	hochgradige Fäulnis mit Madenbefall	Wohnung
16	♂	54	2 Wochen	hochgradige Fäulnis, teilmumifiziert	Wohnung
17	♂	44	3 Wochen	hochgradige Fäulnis, komplette Mumifizierung	
18	♂	62	2 Wochen	hochgradige Fäulnis mit Madenbefall, Mumifizierung	Wohnung
19	♂	47	4,5 Monate	hochgradige Fäulnis mit Madenbefall, Mumifizierung	Wohnung
20	♂	n.b.	4 Wochen	hochgradige Fäulnis mit Madenbefall, Fettwachsbildung, teilskelettiert,	Wasser
21	♀	62	6,5 Monate	hochgradige Fäulnis mit Madenbefall, Fettwachsbildung, teilskelettiert,	Wasser
22	♂	n.b.	7 Monate	hochgradige Fäulnis mit Madenbefall, Fettwachsbildung, teilskelettiert,	Wasser
23	♀	57	6 Monate	hochgradige Fäulnis mit Schimmelbefall, teilweise mumifiziert	Waldsaum
24	♂	n.b.	n.b.	nur ein Fuß, Fettwachsbildung,	Wasser
25	♂	66	1 Woche	höchstgradige Fäulnis mit Madenbefall	
26	♂	50	3-4 Wochen	höchstgradige Fäulnis mit Maden- und Schimmelbefall	Wohnung
27	♀	72	4 Wochen	höchstgradige Fäulnis mit Madenbefall, teilweise mumifiziert	Wohnung
28	♂	n.b.	2 Wochen	höchstgradige Fäulnis mit Madenbefall, teilweise skelettiert	Gartenlaube
29	♂	58	2 Wochen	höchstgradige Fäulnis mit Madenbefall, teilweise skelettiert	Wohnung
30	♂	73	4,5 Monate	höchstgradige Fäulnis mit Madenbefall, teilweise skelettiert	Im Freien
31	♂	76	2 Wochen	höchstgradige Fäulnis mit Madenbefall, teilweise skelettiert	Wohnung
32	♂	58	4 Wochen	höchstgradige Fäulnis mit Madenbefall, teilweise skelettiert	Wohnung

4 Methoden

4.1 Aufarbeitung der Proben

4.1.1 Aufarbeitung der Knochen aus dem Dekontaminationsversuch

Die Knochenproben der Leichenbrände und die Seehundknochen wurden mit einer Kugelschwingmühle (Retsch) pulverisiert und zu 0,5 g Portionen abgewogen. Die Extraktion erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Invisorb[®] Forensic Kit I (Invitek).

Die Ambosse wurden nach der Trocknung mit einem Hammer in UV-bestrahlten Plastiktüten zerkleinert, wobei sie durch ihre geringe Größe nur in ca. vier bis fünf Teile zerfielen. Eine Zerkleinerung in einer Kugelschwingmühle war nicht möglich, da zu wenig Knochenpulver entsteht, um dieses wieder aus der Mühle zu entfernen. Die Extraktion erfolgte ebenfalls nach Herstellerangaben mit dem Invisorb[®] Forensic Kit. Allerdings wurden aufgrund des geringen Gewichts der Knochen (20-30 mg) nur 500 µl Lysispuffer und 100 µl Bone Lysis Enhancer eingesetzt.

4.1.2 Aufarbeitung der Knochen aus den Leichenbränden

Da für die DNA-Analyse die Knochenproben zerstört werden mussten, wurden sie vorher mit einer Digitalkamera (µ Digital 600 von Olympus) von der Vor- und Rückseite fotografiert. Die Proben wurden einer Nummer zugeordnet, um eine Unterscheidung nach der Pulverisierung zu ermöglichen.

Für die äußere Grobreinigung (von diversen Erdanhaftungen) wurden die Knochen unter fließendem Wasser mit einer Zahnbürste vorsichtig gesäubert. Anschließend erfolgte eine subjektive Beschreibung der Knochen, besonders hinsichtlich der entstandenen Verfärbung durch die Verbrennung.

Die Leichenbrände aus der ersten Entnahme (und teilweise aus der zweiten) wurden nach dem Waschen mit vergälltem Ethanol gewaschen und mit doppelt destilliertem Wasser abgespült. Anschließend erfolgte eine Trocknung für ca. 30 min bei 37 °C in einem Brutschrank. Um eventuelle Kontaminationen zu entfernen, die bei der Bergung der Urnen bzw. durch das Öffnen der Urnen entstanden, wurden alle Knochen von beiden Seiten einer UV-Licht-Bestrahlung (254 nm, 30 W, 20 min) in einer Workbench ausgesetzt. UV-Licht dieser Wellenlänge induziert in der eventuell anhaftenden Fremd-DNA die Bildung von

Pyrimidindimeren. Derartig geschädigte DNA kann nicht mehr als Template für eine Amplifikation dienen. Zur vollständigen Trocknung wurden die Knochen wieder bei 37 °C in den Brutschrank verbracht und dort über Nacht getrocknet.

Während der Analyse der Leichenbrandproben aus der zweiten Entnahme wurde die Aufarbeitung verändert, begründet durch Studien, die belegen, dass die Einwirkzeit von 20 min für eine Dekontamination zu kurz ist [Hall & Ballantyne 2004]. Daraufhin wurden die restlichen Knochenproben von der Entnahme im Sommer 2007 (drei Probensätze aus Gremersdorf, vier aus Süderbrarup, drei aus Sörup und einer aus Norderbrarup) und die Proben aus Scharbeutz nicht mit Hilfe von UV-Licht, sondern mit Bleiche dekontaminiert. Diese Knochen wurden, nach der groben Reinigung mittels Zahnbürste, in ein 50 ml Plastikröhrchen gegeben und mit DanKlorix (handelsübliche Bleiche) übergossen und für 7-10 min leicht geschwenkt. Anschließend wurde die Bleiche abgegossen und die Knochen dreimal mit doppelt destilliertem Wasser gespült, um eventuelle Reste der Bleiche zu entfernen. Zur Trocknung wurden auch diese Knochen über Nacht bei 37 °C in einen Brutschrank verbracht.

Am nächsten Tag wurden alle Proben einzeln in saubere Plastiktüten gelegt, die vorher mit UV-Licht bestrahlt wurden und mit einem handelsüblichen Gummihammer zerkleinert, bis das Knochenfragment pulverisiert war. Das entstandene Knochenpulver wurde zu je 0,5 g Portionen abgewogen und sofort mit dem Invisorb® Forensic Kit weiterverarbeitet. Eventuell restliches Knochenpulver wurde in 2,0 ml Reaktionsgefäße überführt und für mögliche spätere Untersuchungen bei -21 °C eingefroren.

4.1.3 Dekalzifizierung der Leichenbrände

Während der Umstellung der Dekontaminationsmethode wurde auch eine Dekalzifizierung der Leichenbrandproben mit Hilfe von EDTA eingeführt. Die restlichen Knochenproben aus der zweiten Entnahme, die schon mit Bleiche gereinigt waren, wurden mit 1 ml EDTA (pH 8, 0,5 M) versetzt, gut gevortext und über Nacht bei 56 °C unter schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Probe bei 3.000 upm zentrifugiert und das EDTA verworfen. Anschließend erfolgte die Zugabe der Reagenzien für den Lysis Schritt.

Da das EDTA nach einer Nacht meist noch eine gelblich bis bräunliche Färbung aufwies und in der Literatur [Adachi et al. 2004, Andelinovic et al. 2005] häufig länger mit EDTA dekalzifiziert wird, wurden die Knochenproben aus Scharbeutz drei Tage lang dekalzifiziert. Dabei wurde, nach der Zentrifugation der Probe, der EDTA-haltige Überstand jeden Tag

gewechselt. Anschließend wurde die Probe gründlich durchmischt und erneut über Nacht im Schüttler inkubiert. Die Extraktion erfolgte mit dem Invisorb® Spin Forensic Kit.

4.1.4 Aufarbeitung der Knochen der Brandleichen

Wenn die Stabilität der Knochen es zuließ, wurden die Knochen unter fließendem Wasser gewaschen und eventuelle Anhaftungen von Knochenhaut oder Russ mit einer Zahnbürste oder Skalpell entfernt. Anschließend erfolgte eine Trocknung der Knochen bei 37 °C in einem Brutschrank über Nacht. Bei zu fragilen Knochen kam nur eine Trocknung zur Anwendung. Um eventuelle Kontaminationen durch Mitarbeiter bei der Bergung und Sektion auszuschließen, wurden alle Knochen für 10 min pro Seite mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt. Jeder Knochen wurde einzeln in saubere Plastiktüten gelegt und mit einem Gummihammer zerkleinert. Das Knochenpulver wurde in 0,4-0,5 g Portionen abgewogen und weiterverarbeitet. Das restliche Knochenpulver wurde in 2,0 ml Reaktionsgefäße eingefroren. Die Extraktion erfolgte mit dem Invisorb® Forensic Kit I.

4.1.5 Aufarbeitung der Proben aus den Fäulnisleichen

Auch diese Knochenproben wurden, soweit möglich, mit einem Skalpell von Geweberesten befreit und grob mit einem Hammer zerkleinert. Dabei lagen die Knochen ebenfalls zwischen zwei Plastiktüten. Anschließend erfolgte eine Portionierung zu je ca. 0,5 g Knochengewebe. Die Extraktion wurde mit dem Invisorb® Forensic Kit I getätigt. Die Organproben wurden in 0,5 g Portionen abgewogen und mit dem Invisorb Spin Tissue Mini Kit von der Routine extrahiert.

4.2 DNA-Extraktion und Aufreinigung

4.2.1 DNA-Extraktion mit dem Invisorb® Forensic Kit I

Für die Extraktion der Gesamt-DNA aus Knochenmaterial kam der Invisorb® Forensic Kit I (Invitek) zum Einsatz.

Die Extraktion der Knochenproben erfolgte nach Herstellerprotokoll (Protocol 5: DNA Isolation from bone or ancient bone material).

Zur Zelllyse wurden je 0,5 g Knochen- oder Zahnpulver mit 1 ml Lysis Puffer D und 200 µl Bone Lysis Enhancer versehen, für 5 min bei Maximalgeschwindigkeit in den Gyrator gestellt und danach im Thermomixer bei 56 °C unter leichtem Schütteln über Nacht inkubiert.

Abweichend vom Herstellerprotokoll, dass extra auf Proteinase K verzichtete, wurde bei den Knochenproben 25 µl Proteinase K (20 mg/ml) hinzugefügt.

Bei Proben, von denen keine 0,5 g Material vorhanden waren, besonders bei den Leichenbrandproben, wurde in diesem Schritt nur die Hälfte der in der Extraktions-Anleitung angegebenen Menge der jeweiligen Reagenzien eingesetzt.

Nach der Inkubation erfolgte am nächsten Tag eine erneute fünfminütige Behandlung im Gyrator mit anschließender Zentrifugation für 1 min bei 13.000 upm. Der Überstand wurde in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Zum Binden der DNA wurden 15 µl Carrier-Suspension hinzugegeben, die Proben gevortext und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation für 1 min bei 10.000 upm bildete sich ein Pellet und der Überstand wurde verworfen.

Das Pellet wurde mit 1 ml Waschpuffer versetzt und solange gevortext, bis es resuspendiert war. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation für 30 sek bei 10.000 upm. Der Überstand wurde verworfen. Dieser Waschvorgang, beginnend mit der Zugabe des Waschpuffers, wurde zweimal wiederholt.

Das Pellet wurde bei 56 °C im Thermomixer mit offenem Reaktionsgefäß unter leichtem Schütteln getrocknet. Dabei musste ein Durchtrocknen der Pellets zwingend vermieden werden. Um die extrahierte DNA aus dem Pellet zu gewinnen, wurde dieses in 55 µl Elutionspuffer gelöst und gevortext. Anschließend wurde die Probe für 5 min bei 60 °C im Thermomixer unter leichtem Schütteln inkubiert und 2 min bei 13.000 upm zentrifugiert. Der auf diese Weise gewonnene Überstand enthielt die extrahierte DNA und wurde vorsichtig in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, ohne Carriersubstanz mitzutragen.

4.2.2 Aufreinigung der DNA mit dem MinElute® PCR Purification Kit

Dieses Kit von Qiagen dient (laut Manual) der Isolierung von doppelsträngigen DNA-Fragmenten nach PCR-Reaktionen. In dieser Arbeit diente es zur Entfernung von Inhibitoren, die bei der Extraktion mit dem Invisorb® Forensic Kit I meist mit isoliert werden. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerprotokoll (MinElute PCR Purification Kit Protocol using a microcentrifuge).

Auf 10 µl DNA-Extrakt wurden 50 µl Puffer PBI pipettiert und gemischt. Dabei sollte sich die Mischung gelb färben, um einen optimalen pH-Wert für die DNA-Bindung an der Silica-Membran zu gewährleisten. Nachdem ein MinElute Säulchen in ein 2,0 ml Reaktionsgefäß eingesetzt wurde, erfolgte die Zugabe der Probe. Durch die einminütige Zentrifugation bei 13.000 upm kam es zur Bindung der DNA im Filter. Das Filtrat wurde verworfen und der

Filter ins gleiche Reaktionsgefäß zurückgesetzt. Für den Waschschrift wurden 750 µl Puffer PE auf den Filter pipettiert und für 1 min zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und eine zusätzliche Zentrifugation (bei maximaler Geschwindigkeit für eine Minute) sorgte für die Entfernung des restlichen Waschpuffers. Der Filter wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 10 µl Puffer EB versehen. Durch die einminütige Inkubation bei Raumtemperatur löste sich die DNA vom Filter und befand sich nach der Zentrifugation für 1 min bei 13.000 upm im Filtrat.

4.2.3 Aufreinigung der DNA mit dem QIAquick® Nucleotide Removal Kit

Auch dieses Kit ist ursprünglich für die Aufreinigung doppelsträngiger DNA-Fragmente nach einer PCR-Reaktion entwickelt worden. Nach Rücksprache mit Vertretern der Firma QIAGEN eignet sich dieses Kit noch besser für die Entfernung von PCR-Inhibitoren, die bei der Extraktion mit isoliert werden. Außerdem ist bei diesem Kit das Elutionsvolumen größer, so dass mehr PCR-Analysen aus einem Ansatz ermöglicht werden.

Für die Aufreinigung wurden 10 µl DNA-Extrakt mit 100 µl Puffer PN vermischt und auf die QIAquick Spin Säulchen aufgetragen, die zuvor in ein passendes 2,0 ml Reaktionsgefäß gesetzt wurden. Um die DNA im Filter zu binden, wurde dieser 1 min bei 6.000 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Filter in das Reaktionsgefäß zurückgesetzt. Durch die Zugabe von 750 µl Puffer PE, und die anschließende Zentrifugation bei 6.000 upm für 1 min, wurde die Probe gewaschen. Das Filtrat wurde verworfen und durch eine weitere Zentrifugation (bei 13.000 upm für 1 min) der Rest des Waschpuffers entfernt. Der Filter wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Lösung der DNA aus dem Filter erfolgte bei Zugabe von 30 µl Puffer EB und der einminütigen Inkubation bei Raumtemperatur sowie der Zentrifugation bei 13.000 upm für 1 min. Die aufgereinigte DNA befand sich im Filtrat und der Filter konnte entfernt werden.

4.2.4 DNA-Extraktion mit dem Invisorb® Spin Forensic Kit

Im Laufe der Arbeit zeigte sich, dass bei der Extraktion von historischen Knochen- und Zahnproben mit dem Invisorb® Forensic Kit häufig auch Hemmstoffe mit isoliert wurden, die eine zusätzliche Aufreinigung erforderten. Daraufhin wurde, nach Rücksprache mit Invitex-Vertretern, das Invisorb® Spin Forensic Kit benutzt.

Durch das verwendete Filtersystem werden die Hemmstoffe nicht mit isoliert. Ein weiterer Vorteil dieses Kits ist die schnellere und einfachere Handhabung, wobei durch die minimalen

Aktionen des Benutzers auch Kreuzkontaminationen zwischen den einzelnen Proben vermieden werden können.

Die Extraktion wurde mit kleinen Änderungen nach Herstellerprotokoll (Protocol 10: DNA isolation from bones) durchgeführt.

Nach einer erfolgreichen Dekalzifizierung, sichtbar an der feinen Pulverschicht auf dem restlichen Knochenpulver, erfolgte die Zugabe von 1 ml Bone Lysis Enhancer. Die Proben wurden gevortext und mindestens 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit erfolgte eine Zentrifugation des Ausgangsmaterials und 300 µl des Überstandes wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch die Zugabe von 100 µl Lysis Puffer M, 20 µl Carrier RNA und 10 µl Proteinase K wurde die Lyse der Zellen über Nacht bei 56 °C unter kontinuierlichem Schütteln im Thermoschüttler fortgesetzt.

Um die Bindung der DNA am Filter zu optimieren, wurden 200 µl Binding Puffer B6 zugegeben und die Probe vorsichtig mit der Pipette gemischt. Nachdem der Spin Filter in das 2,0 ml Auffanggefäß gesetzt wurde, erfolgte die Überführung des Lysats auf den Filter. Nach der einminütigen Zentrifugation bei 13.000 upm war die DNA im Filter gebunden. Für den Waschschrift wurden zunächst 300 µl Waschpuffer I auf den Filter pipettiert und dieser für 30 sek bei 13.000 upm zentrifugiert. Der Filter wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 600 µl Waschpuffer II versetzt und 30 sek bei 13.000 upm zentrifugiert. Um letzte Rückstände des Waschpuffers (Ethanol basierend) zu entfernen, erfolgte eine weitere Zentrifugation für 2 min bei 13.000 upm. Für die Lösung der DNA aus dem Filter wurde dieser in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und mit 60 µl vorgewärmten Elution Puffer D versehen. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für eine Minute. Durch eine weitere Zentrifugation bei 13.000 upm für 1 min befand sich die DNA im Filtrat und der Filter konnte verworfen werden.

4.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

4.3.1 Allgemein

Im Jahre 1985 entwickelte Kary Mullis die PCR-Methode, für die er 1993 den Nobelpreis für Chemie erhielt. Die PCR bietet die Möglichkeit, definierte DNA-Bereiche gezielt zu vermehren. Es sind dafür nur geringste Mengen an DNA erforderlich und deshalb wird diese Methode besonders häufig u.a. in der Forensik und in der DNA-Analyse von historischen Proben eingesetzt. Der entscheidende Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die Nachweisgrenze bei nur einem DNA-Ausgangsmolekül (mit noch vorhandener Ziel-Region) liegen kann [Brinkmann & Wiegand 1997].

Um die gewünschten DNA-Bereiche amplifizieren zu können, werden Oligonukleotidprimer angewendet. Dabei handelt es sich um kurze (ca. 20-30 bp lang), einzelsträngige DNA-Moleküle. Unter den richtigen Reaktionsbedingungen und bei der Anwesenheit von genügend freien Nukleotiden (dNTPs) kann eine DNA-Polymerase die Primer entlang der einzelsträngigen denaturierten DNA-Matrize verlängern und so einen neuen DNA-Strang komplementär zur Matrize synthetisieren [Newton & Graham 1994].

4.3.2 Überprüfung von DNA–Qualität und –Quantität mittels Screening-PCRs

Um einen ersten Überblick über die Qualität und Quantität der extrahierten DNA zu erhalten und um das weitere Vorgehen zu bestimmen, werden zwei PCRs eingesetzt. Zum einen die sehr sensitive Duplex-PCR, die anzeigt, ob generell DNA vorhanden ist. Zum anderen die Screening-PCR, die Auskunft darüber gibt, ob die PCR durch Inhibitoren gestört wird, ob ein Mischprofil vorliegt oder ob STR-Analysen und Sequenzierungen der mtDNA möglich sind. Beide PCRs sind sehr kostengünstig gegenüber kommerziell erhältlichen PCR-Kits und brauchen weder zusätzliche Laborausrüstung noch technisches Know-How. Somit sind sie besonders geeignet, schnell sichere Ergebnisse zu liefern, welche Analysemethode für die Identifizierung (STR-Systeme oder Sequenzierung der mtDNA) am besten geeignet ist.

4.3.2.1 Duplex-PCR

Die Duplex-PCR wurde in der Arbeitsgruppe von Wurmb-Schwark et al. am Institut für Rechtsmedizin entwickelt und 2004 veröffentlicht.

Gerade bei altem und stark degradiertem Material sind nur noch kleinere DNA-Fragmente vorhanden. Daher weist die Duplex-PCR ein 164 bp großes nukleäres DNA-Fragment und ein

260 bp großes mitochondriales DNA-Fragment nach. Deshalb wird sie in dieser Arbeit, genauso wie die Screening-PCR, als Vortest vor einer weiteren Analyse eingesetzt.

Das 260 bp große mitochondriale Fragment ist ein Teil des ND1 Gens, welches mit dem Primerpaar L15/H16 amplifiziert wird. Das 164 bp große nukleäre Fragment ist Teil des Betaglobin-Gens. Die verwendeten Primersequenzen sind der Tabelle 7 zu entnehmen.

Tab. 7: Verwendete Primersequenzen für die Duplex-PCR.

Beide Primer wurden von der Firma Biomers synthetisiert.

Primer	Sequenz	Markierung	Quelle
β-Globin	F: 5` ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC 3` R: 5` GTC TCC TTA AAC CTG TCT TG 3`	JOE	von Wurmb-Schwark [2004]
L15/H16	L15: 5` AAC ATA CCC ATG GCC AAC CTC CTA C 3` H16: 5` CAT AGT AG AGA GCG ATG GTG AGA G 3`	FAM	von Wurmb-Schwark [2004]

Anders als 2004 veröffentlicht, ist das Gesamtvolumen der PCR-Reagenzien auf die Hälfte reduziert (12,5 µl). Der Mastermix setzt sich aus folgenden Reagenzien zusammen und ergibt ein Endvolumen ohne DNA-Template von 11,5 µl. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf das Gesamtvolumen von 12,5 µl.

- 1,25 µl Immobuffer 10x, 10 %
- 1,0 µl dNTPs, 200 µM
- 0,5 µl DMSO, 4%
- 0,375 µl MgCl₂, 1,5 mM
- 0,25 µl β-Globin Primer, 0,1 µM
- 0,125 µl L15/H16 Primer, 0,05 µM
- 0,1 µl Immolase (Polymerase), 0,5 units
- 7,9 µl HPLC-H₂O

Nach der sorgfältigen Durchmischung des Mastermixes wird dieser in 0,2 ml Reaktionsgefäße verteilt. Von der extrahierten DNA wird routinemäßig 1 µl als Template hinzugegeben. Als Positivkontrolle dient 1 µl DNA eines Mitarbeiters des Institutes, die bereits zuvor auf das Vorhandensein von genügend DNA getestet wurde. Als Negativkontrolle fungiert 1µl HPLC-H₂O. Anschließend durchläuft die PCR in einem Thermocycler -unter den in Tabelle 8 angegebenen Bedingungen- 40 Zyklen.

Tab. 8: Temperaturprofil für die Duplex-PCR

	40 Zyklen				
Initial Inkubation	Denaturierung	Annealing	Extension	Final Extension	Final Step
94° C 5 min	94° C 1 min	55° C 1 min	72° C 2 min	72° C 0,01 min	20° C ∞

Die Nachweisgrenze der Duplex-PCR beträgt 12,5 pg für nukleäre DNA und 100 fg für mitochondriale DNA bei 40 Zyklen.

Bevor die Screening-PCR entwickelt wurde, sind inhibitorische Substanzen durch die Zugabe von 1 µl Kontroll-DNA (1 ng/µl, Zelllinie von Promega) detektiert worden. Die Kontroll-DNA wurde zusätzlich zur Template-DNA in den PCR-Ansatz pipettiert. Bei einem Ausfall der Signale in der anschließenden Kapillarelektrophorese kann davon ausgegangen werden, dass die Probe hemmende Substanzen enthält.

4.3.2.2 Screening-PCR

Die Screening-PCR, die in der Arbeitsgruppe von Wurmb-Schwark et al. im Rahmen einer Diplomarbeit entwickelt und 2009 veröffentlicht wurde, liefert einen ersten Überblick über die Qualität und Quantität der untersuchten Proben.

Diese PCR umfasst eine doppelte Geschlechtsbestimmung mittels Amelogenin und zwei Y-STR-Systemen (DYS390 und DHS391) und den Nachweis von zwei autosomalen STR-Merkmalen (vWA und TH01). Des Weiteren liefert sie Anhaltspunkte für das Vorhandensein von mtDNA und damit für die Effektivität einer Sequenzierung. Die geschieht über die Amplifikation von zwei unterschiedlich großen mtDNA-Fragmenten (280 bp und 439 bp), die in der HVI-Region der Mitochondrien-DNA liegen.

Da diese PCR speziell für forensische und historische Proben entwickelt wurde, die meist stark degradierte DNA beinhalten, wurden die Primersequenzen so gewählt, dass die entstehenden Amplifikate für nukleäre DNA nicht größer als 200 bp sind. Zudem handelt es sich bei den verwendeten STR-Loci um Datenbanksysteme, die eine Zuordnung und Vergleichbarkeit der Werte ermöglichen.

Als Besonderheit dieser PCR ist der Qualitätssensor zu nennen. Damit kann nachgewiesen werden, ob die PCR-Reaktion durch Hemmstoffe behindert wird oder ob in der Probe keine amplifizierbare DNA mehr enthalten ist. Bei diesem Sensor handelt es sich um ein DNA-Fragment des Süßwasserpolyphen Hydra (zoologische Einordnung siehe Anhang 10.2). Dafür wird in den PCR-Ansatz Hydra-DNA eingesetzt und mit einem speziellen Primerpaar erfolgt die Amplifikation eines 271 bp großen Fragmentes. Das bedeutet, dass das Signal für das Hydra-DNA-Fragment auch nachgewiesen werden kann, wenn keine humane DNA in der untersuchten Probe vorhanden ist und die PCR funktioniert hat. Fällt das Signal dagegen aus, kann die PCR von PCR-Inhibitoren gestört worden sein. Der Süßwasserpolyph wurde ausgewählt, weil er nicht ubiquitär im Lebensraum vom Menschen vorkommt und somit keine Kontaminationsgefahr besteht. Des Weiteren sind die Primersequenzen nicht im

humanen Genom nachweisbar, so dass das Hydra-Fragment unabhängig von humaner DNA amplifiziert werden kann. Die Primersequenzen aller verwendeten Systeme sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tab. 9: Verwendete Primersequenzen und Konzentrationen in der Screening-PCR.

RM: Reaktionsmix, Farbm: Farbmarkierung

Primer	Sequenz	Konzent. im RM	Farbm.	Hersteller
DYS390	F: 5` CTG CAT TTT GGT ACC CCA TA 3` R: 5` GCA ATG TGT ATA CTC AGA AAC AAG G 3`	0,24µM	JOE	Biomers
DYS391	F: 5` TTC AAT CAT ACA CCC ATA TCT GTC 3` R: 5` GAT AGA GGG ATA GGT AGG CAG GC 3`	0,2 µM	JOE	Biomers
vWA	F: 5` AGA ATA ATC AGT ATG TGA CTT GGA TTG 3` R: 5` CAG ATG ATA AAT ACA TAG GAT GGA TG 3`	0,2 µM	FAM	Biomers
THO1	F: 5` GTC ACA GGG AAC ACA GAC TC 3` R: 5` ATT CCC ATT GGC CTG TTC CT 3`	0,2 µM	NED	Applied Biosystems
Amelogenin	F: 5` CCT TTG AAG TGG TAC CAG AGC A 3` R: 5` GCA TGC CTA ATA TTT TCA GGG AA 3`	0,08 µM	FAM	Biomers
mt 280	F: 5` TTA ACT CCA CCA TTA GCA CC 3` R: 5` GGA GTT GCA GTT GAT GTG T 3`	0,05 µM	FAM	Biomers
mt 439	F: 5` TTA ACT CCA CCA TTA GCA CC 3` R: 5` GAG GAT GGT GGT CAA GGG AC 3`	0,05 µM	FAM	Biomers
Hydra	F: 5` GAG CGT TTC CGA TGC CCA G 3` R: 5` CTC CGA TCC AGA CTG AAT A 3`	0,16 µM	NED	Applied Biosystems

Für die erfolgreiche Amplifikation werden die folgenden Reagenzien zusammenpipettiert und sorgfältig gemischt. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf das Gesamtvolumen von 12,5 µl.

- 1,25 µl Immobuffer 10x, 10 %
- 1,0 µl dNTPs, 200 µM
- 1,0 µl Hydra-DNA
- 0,5 µl DMSO, 4 %
- 0,5 µl TMAC, 4 %
- 0,375 µl MgCl₂, 1,5 mM
- 0,1 µl Immolase (Polymerase), 0,5 units
- 3,825 µl HPLC-H₂O
- Primer (siehe Tabelle 9)

Anschließend wird der Mastermix in 0,2 ml Reaktionsgefäße mit einem Volumen von je 11,5 µl verteilt. Nach der Zugabe von 1 µl Proben-DNA sowie dem Ansatz von zwei Positiv- (ein männliches und ein weibliches Profil) und mindestens einer Negativkontrolle werden die Reaktionsgefäße verschlossen und in einer Minizentrifuge kurz zentrifugiert. Die PCR durchläuft 30 Zyklen mit folgendem Temperaturprofil (Tab.10). Die Auswertung der

Screening-PCR nach der Kapillarelektrophorese erfolgt mit Hilfe einer eigens entwickelten Allel-Leiter, die die STR-Systeme und Amelogenin umfasst.

Tab. 10: Temperaturprofil für die Screening-PCR.

	30 Zyklen				
Initial Inkubation	Denaturierung	Annealing	Extension	Final Extension	Final Step
94° C 5 min	94° C 30 sek	58° C 1 min	72° C 2 min	72° C 10 min	20 ∞

4.3.2.3 Multiplex-PCR

In einer Multiplex-PCR können mehrere unabhängige STR-Systeme in einer PCR amplifiziert werden. Zur Unterscheidung der einzelnen STR-Loci werden an das 5'-Ende des Vorwärtsprimers fluoreszenzmarkierte Marker gebunden. Dies ermöglicht auch, Fragmente unterschiedlicher STRs gleicher Größe zu unterscheiden.

Die fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte werden automatisch in einer einzigen kapillarelektrophoretischen Auftrennung analysiert. Dabei erfolgt die Zuordnung der Allele in den Kurvendarstellungen anhand einer gleichzeitig analysierten und dargestellten Allel-Leiter, die alle häufigen, in der Bevölkerung vorkommenden, Merkmale darstellt.

Dabei ist eine Multiplex-PCR immer ein Kompromiss zwischen idealen Bedingungen und der Effektivität der Amplifikation. Jedoch ermöglicht die Multiplex-PCR die Beschleunigung des Arbeitsprozesses [Sparkes et al. 1996].

Da in dieser Arbeit (bis auf die Screening-PCR) nur kommerzielle STR-Multiplex-PCRs benutzt wurden, ist davon auszugehen, dass diese im Bezug auf Annealingtemperatur und Primerauswahl ideal austariert sind.

- Identifiler

In dieser Arbeit kam der AmpF ℓ STR[®] Identifiler[™] (Applied Biosystems) zum Einsatz, mit dem in einer PCR 15 autosomale STR-Systeme und das geschlechtsbestimmende Amelogenin-System amplifiziert werden. Damit ist dieses Kit speziell für die amerikanische Datenbank mit 13 STR-Systemen etabliert worden, umfasst aber auch die STR-Loci, die in anderen Datenbanken weltweit analysiert werden.

Um die 16 Systeme gut voneinander unterscheiden zu können, werden beim Identifiler-Kit fünf verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet (PET[™], LIZ[™], 6-FAM[™], VIC[™] und NED[™]). LIZ wird für den GeneScan[™]-500 Größenstandard benötigt.

Für den Mastermix werden Puffer, Primer und ATG sowie Aqua bidest in den folgenden Mengen angesetzt und gründlich gemischt.

- 2,625 µl Puffer
- 1,375 µl Primer
- 0,125 µl ATG
- 1,5 µl HPLC-H₂O

Anschließend wird der Mastermix mit einem Volumen von 5,25 µl in 0,2 ml Reaktionsgefäße verteilt und 1 µl DNA-Lösung hinzugefügt. Bei jeder PCR werden eine Positivkontrolle (1 µl DNA eines Mitarbeiters mit bekannten STR-Profil) und mehrere Negativkontrollen (1 µl Aqua Bidest) mitgeführt. Insgesamt durchläuft der Identifiler 28 - 35 Zyklen mit dem Temperaturprofil aus Tabelle 11.

Tab. 11: Temperaturprofil für den Identifiler.

	28 – 35 Zyklen				
Initial Inkubation	Denaturierung	Annealing	Extension	Final Extension	Final Step
95° C 11 min	94° C 1min	59° C 1 min	72° C 1 min	72° C 60 min	10° C ∞

Laut Angaben des Herstellers arbeitet das Kit am optimalsten, wenn eine Konzentration von 0,05 – 0,125 ng/µl DNA eingesetzt wird. Bei degradierter DNA sei es aber sinnvoll, mehr DNA einzusetzen. Die Nachweisgrenze soll bei 20 pg liegen.

- Powerplex

Mit dem Powerplex ES Multiplex Kit werden acht STR-Systeme und das geschlechtsbestimmende Amelogenin-System nachgewiesen. Davon sind sieben STR-Bereiche auch im Identifiler enthalten. Weiterhin wird der STR-Locus SE33, welcher einen außerordentlich hohen Polymorphiegrad aufweist, mit amplifiziert [Patzelt, 2003]. Für das Powerplex Kit werden nur vier Fluoreszenzfarbstoffe benötigt (FL, TMR, JOE, CXR), die vierte Farbe wird (CXR) vom Längenstandard ILS 600 beansprucht.

Für den Mastermix werden folgende Reagenzien zusammenpipettiert.

- 0,625 µl Puffer
- 0,625 µl Primer
- 0,1375 µl ATG
- 3,86 µl HPLC-H₂O

Die Reagenzien werden sorgfältig gemischt und anschließend in 0,2 ml Reaktionsgefäße mit einem Volumen von 5,25 µl verteilt. Nach der Zugabe von 1 µl Proben-DNA, sowie dem Ansatz einer Positiv- und mindestens einer Negativkontrolle, durchläuft die Powerplex-PCR insgesamt 31-35 Zyklen mit dem Temperaturprofil aus Tabelle 12.

Tab. 12: Temperaturprofil für die Powerplex ES.

		10 Zyklen			21 – 25 Zyklen				
Initial Inkubat	Initial Inkubat	Denaturierung	Anneal.	Extens.	Denaturierung	Anneal.	Extens.	Final Extens.	Final Step
95° C 11 min	96° C 1 min	94° C 30 sek	55° C 30 sek	72° C 30 sek	90° C 1 min	60° C 1 min	70° C 1,30 min	60° C 30 min	15° C ∞

4.4 Fragmentanalyse mittels Kapillarelektrophorese

Die gewonnenen PCR-Produkte werden in einem ABI Prism™ 310 Genetic Analyser mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe der GeneScan® Analysis Software (Version 3.1.2.) der Firma Applied Biosystems analysiert.

Dies ist möglich, da die eingesetzten Vorwärtsprimer an ihrem 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Zusätzlich wird ein Längenstandard eingesetzt, der DNA-Fragmente mit definierten Größen beinhaltet.

Die Elektrophorese wird mit 15.000 Volt gestartet mit dem Ziel, ein elektrisches Feld zu erzeugen. Hier wandern die DNA-Fragmente durch ein gelartiges Polymer (Polymer POP 4) in der Kapillare von der Kathode zur Anode. So werden sie der Länge nach aufgetrennt. Auf ihrem Weg durch das Gel werden die Fragmente mit Hilfe eines Lasers detektiert, der an einer festen Position am Fenster der Kapillare angebracht ist. Der Laserstrahl regt die Farbmoleküle zur Fluoreszenz an. Hier wird mit einem optischen System die Fluoreszenz auf einen Detektor mit CCD-Kamera geleitet und dort nach Wellenlänge und Signalstärke in digitale Messwerte umgewandelt. Anschließend werden die Werte mittels der Software mit den bekannten Fragmentlängen aus den Standards abgeglichen und zugeordnet. Deshalb sind die mitgeführten Standards für die jeweiligen PCRs unterschiedlich:

Duplex-PCR und Screening-PCR	0,2 µl Rox 500
Powerplex ES	0,3 µl ILS 600
Identifiler	0,2 µl Liz 500

Diese Standards werden mit Formamid auf ein Reaktionsvolumen von 12 µl aufgefüllt und in spezielle 0,5 ml Reaktionsgefäße verteilt.

Daraufhin wird in jedes Gefäß 1 µl PCR-Produkt pipettiert und dieses mit einem Gummisepta verschlossen. Die Fragmentanalyse wird entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

4.5 Quantifizierung mittels Realtime-PCR

Mit Hilfe einer Realtime-PCR können die entstandenen Amplifikate direkt während ihrer Bildung erfasst werden. Es binden während der Annealing-Phase nicht nur die Primer, sondern auch spezifische Sonden. Diese sind am 5'-Ende mit einem fluoreszenzmarkierten Reporter und am 3'-Ende mit einem nichtfluoreszenzmarkierten Quencher sowie einem „minor groove binder“, der die Schmelztemperatur erhöht, markiert. Deshalb können auch kurze Fragmente amplifiziert werden. Erreicht die Taq-Polymerase die Sonde, wird diese durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase gespalten. Es kommt zu einer Trennung des Reporters vom Quencher und eine Fluoreszenz wird messbar. Die Sonde löst sich anschließend ebenfalls vom Strang. Dieser Vorgang ist schematisch in Abbildung 9 dargestellt.

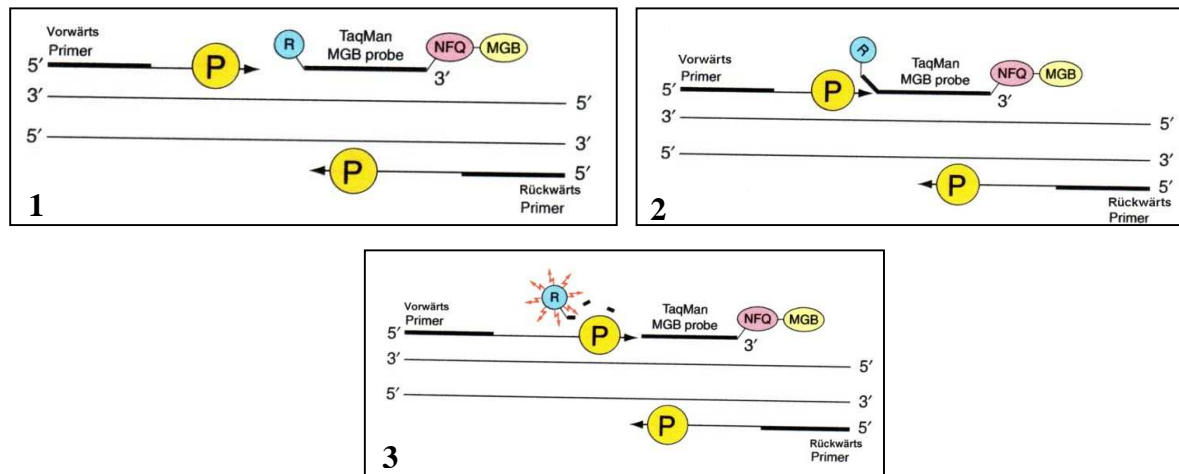


Abb. 9: Prinzip der Realtime-PCR (schematisch).

(1) Primer und Sonden lagern sich an die spezifische Sequenz, (2) die Polymerase erreicht die Sonde und spaltet den Reporter von der Sonde ab, (3) durch Trennung des Reporters von Quencher ist Fluoreszenz messbar. P – Taq-Polymerase, R – Reporter, NFQ – nicht fluoreszierender Quencher, MGB – minor groove binder [aus: User's Manual Quantifiler Kits, Applied Biosystems, 2006, modifiziert]

Für die Quantifizierung der nukleären DNA wird der Quantifiler-Kit von Applied Biosystems genutzt. Hierbei wird ein 62 bp Fragment aus dem Telomerase-Gen amplifiziert und mit Hilfe einer FAM markierten Sonde detektiert.

Zusätzlich zu den Proben werden mehrere Standards (0,02 ng, 0,2 ng, 2 ng, 20 ng und 200 ng) quantifiziert, aus deren Standardkurve die Software die unbekannten nukleären DNA-Mengen ermittelt.

Bei der Anwendung des Kits werden jeweils 25 µl pro Ansatz, bestehend aus 10,5 µl Quantifiler Primer Mix und 12,5 Reaktionsmix sowie 2 µl DNA-Lösung, in spezielle ThermoFast® 96 Detection Plates pipettiert und mit einer Optical Adhesive Cover Folie verschlossen. Im Anschluss wird die Platte für 2-3 min bei 2.000 upm zentrifugiert. Die PCR-Bedingungen

sind in Tabelle 13 aufgelistet. Die genaue Sensitivität des Kits wird vom Hersteller nicht angegeben. Im Rahmen einer Diplomarbeit, am Institut für Rechtsmedizin Kiel, konnte eine Nachweisgrenze von ca. 12,5 pg (~ 2 Zellen) festgelegt werden.

Da die Proben als auch die Standards in Doppelbestimmung pipettiert werden, kann die Software aus den beiden gemessenen Werten einen Mittelwert bestimmen. Zusätzlich wird pro Realtime-PCR eine Negativkontrolle in Doppelbestimmung quantifiziert, so kann eine Kontamination ausgeschlossen werden. Des Weiteren ist die Kurve der Negativkontrolle für das Festlegen der Ct-Linie erforderlich, da die Ct-Werte immer über denen der Negativkontrolle liegen müssen.

Tab. 13: PCR-Profil für die Realtime-PCR.

		40 Zyklen	
Erhitzen	Denaturierung	Denaturierung	Annealing + Elongation
50 °C 10 sek	95 °C 4 min	95 °C 30 sek	60 °C 1 min

4.6 Sequenzierung der mitochondrialen DNA

Durch die Sequenzierung der mitochondrialen DNA ist es möglich, die Abfolge der DNA-Basen zu bestimmen und somit Sequenzvariationen nachzuweisen.

Die Grundlagen dieser Methode haben Walter Gilbert und Fred Sanger geschaffen, die dafür 1980 mit dem Nobelpreis geehrt wurden.

Vergleichbar mit einer PCR erfolgt auch bei der Sequenzierung eine DNA-Synthese, bei der Primer an Zielsequenzen binden und der Strang neu synthetisiert wird. Jedoch werden zusätzlich zu den vier Nukleotiden (Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin) auch ein geringer Anteil an Nukleotiden ohne 3'-OH-Gruppe in den Reaktionsansatz eingesetzt. Diese Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) können keine Esterbindung zum nächsten Nukleotid eingehen. Weil diese ddNTPs statistisch an allen Positionen eingebaut werden, wird die DNA-Synthese statistisch an allen Positionen abgebrochen. Weiterhin sind die ddNTPs mit einem Fluoreszenzfarbstoff unterschiedlicher Farbe markiert. Anhand der Markierung kann ein Laser während der Kapillarelektrophorese die Nukleotid-Abfolge analysieren [Murken et al. 2006].

4.6.1 Amplifikation mitochondrialer DNA

Die Amplifikation der mitochondrialen DNA in dieser Arbeit erfolgt im Bereich der HVI-Region im D-Loop. Diese Region ist ca. 400 bp lang und sehr variabel. So unterscheiden sich zwei zufällig ausgewählte, nicht verwandte Personen, in der D-Loop-Region in drei von 100 Nukleotidpositionen [Hummel 2003].

In dieser Arbeit kamen drei verschiedene Primerpaare zur Anwendung. Daraufhin konnten drei verschieden große Sequenzbereiche amplifiziert werden. Die Primersequenzen sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tab. 14: Primersequenzen für die Amplifikation der mtDNA.

Die Sequenzen sind aus der Veröffentlichung von Pfeiffer et al. [2001] entnommen.

Fragmentlänge	Primersequenz	Bereich	Hersteller
439 bp	F: 5` TTA ACT CCA CCA TTA GCA CC 3` R: 5` GAG GAT GGT GGT CAA GGG AC 3`	15971 bp – 16410 bp	Biomers
280 bp	F: 5` TTA ACT CCA CCA TTA GCA CC 3` R: 5` GGA GTT GCA GTT GAT GTG T 3`	15971 bp – 16251 bp	Biomers
220 bp	F: 5` CCC CAT GCT TAC AAG CAA GT 3` R: 5` GAG GAT GGT GGT CAA GGG AC 3`	16190 bp – 16410 bp	Biomers

Für die Herstellung des Amplifikats wird ein Mastermix aus folgenden Reagenzien zusammenpipettiert:

- 2 µl Primermix, 0,4 µM
- 2,5 µl Puffer 10x, 10 %
- 2 µl dNTPs, je 200 µM
- 0,75 µl MgCl₂, 1,5 mM
- 1 µl DMSO, 4 %
- 0,2 µl Immolase, 5 u/µl
- 11,5-15,5 µl HPLC-H₂O

Das Reaktionsvolumen des Mastermixes schwankt dabei zwischen 20 µl und 24 µl, abhängig von der DNA-Qualität der zu untersuchenden Probe. Bei schlechter DNA-Qualität werden 5 µl DNA hinzugefügt und bei guter Qualität 1 µl. So ergibt sich immer ein Gesamtreaktionsvolumen von 25 µl pro Probe. Der Mastermix wird gut gemischt und auf 0,2 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Ergänzend kommen 1 µl oder 5µl Ziel-DNA hinzu, sowie Positiv- und Negativkontrollen. Insgesamt durchläuft die Amplifikation, mit dem in Tabelle 15 gezeigten Temperaturprofil, 36 Zyklen.

Tab. 15: Temperaturprofil der Amplifikations-PCR für die Sequenzierung der mtDNA.

	36 Zyklen				
Inkubation	Denaturierung	Annealing	Extension	Extension	Step
95 °C 5 min	95 °C 1 min	56 °C 1 min	72 °C 2 min	72 °C 30 min	15 °C ∞

4.6.2 Kontrolle der Amplifikate auf einem Agarosegel

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode für die Auftrennung von DNA-Fragmenten hinsichtlich ihrer Größe. Dies resultiert aus den negativ geladenen Molekülen der Nukleinsäuren. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die negativ geladenen Moleküle durch die Gelmatrix zur positiven Elektrode. Die kleineren DNA-Moleküle kommen schneller voran, da sie seltener mit der Matrix kollidieren [Martin 1996].

Zur Herstellung eines einprozentigen bzw. zweiprozentigen Gels werden 1 g bzw. 2 g Agarose mit 1 x TBE-Puffer auf 100 ml aufgefüllt und leicht geschwenkt, so dass sich die Agarose gleichmäßig verteilt. Das Gemisch wird in einer Mikrowelle für 2 min bei 800 W aufgeköcht. Anschließend werden 5 µl Ethidiumbromid der viskösen Lösung zugegeben.

Ethidiumbromid ist ein Farbstoff, der stark fluoresziert, sobald er in DNA interkaliert. Dabei schiebt er sich zwischen benachbarte Basen eines DNA-Stranges. Im interkalierten Zustand kann das Molekül UV-Licht absorbieren und diese Energie im sichtbaren Bereich wieder abstrahlen [Martin 1996].

Mit den verwendeten Gelen kann eine Mindestmenge von etwa 5 ng nachgewiesen werden. Das Gel wird in eine horizontale Minigelkammer aus durchsichtigem Plexiglas gegossen. Um später Aussparungen, sogenannte „Slots“, zu erhalten, werden „Kämme“ in das noch flüssige Gel gesteckt. Nach ca. 45 min ist das Gel auspolymerisiert und die „Kämme“ können entfernt werden. Das Gel wird daraufhin mit 1x TBE-Puffer vollständig bedeckt. Vor der Auftragung der Proben auf das Gel werden 5 µl der DNA-Probe mit 5 µl Ladepuffer, der als Farbmarker niedermolekulares Bromphenolblau enthält, vermengt. Die verwendete DNA-Leiter (HyperladderTM I bzw. IV von Bionline) beinhaltet bereits einen Farbmarker. Später werden die Leitern und die vorbereiteten Proben submer in die Aussparungen pipettiert. Die Elektrophorese wird mit 50 V gestartet. Basierend auf der Unsichtbarkeit der DNA während des Laufes wird der Fortschritt an der Farbfront abgelesen, die sich schneller –als selbst kleinste DNA-Fragmente– durch das Gel bewegt.

Zur Auswertung der Banden unter UV-Licht sowie zur Fotodokumentation des Gels kommt der Gel-Doc (Bio-Rad) zum Einsatz.

4.6.3 Aufreinigung mittels Invisorb Spin PCrapid Kit

Alle PCR-Produkte, die auf dem Agarosegel gut erkennbare Signale zeigten, werden mit dem Invisorb Spin PCrapid Kit von der Firma Invitek aufgereinigt. Mit Hilfe dieses Kits werden freie Nukleotide und Primer aus den PCR-Produkten selektiv ausgelesen.

Dafür werden zum verbleibenden PCR-Produkt (20 µl) 130 µl Puffer P hinzupipettiert und gemischt. Nachfolgend wird diese Mischung mittig auf den bereitgestellten Spin Filter gegeben und dieser bei 10.000 upm für 30 sek zentrifugiert. Somit sind die PCR-Produkte an der Membran gebunden. Nach der Zugabe von 700 µl Waschpuffer folgt eine weitere Zentrifugation für 30 sek bei 10.000 upm. Das Filtrat wird verworfen und der Filter nochmals für 3 min bei 13.000 upm zentrifugiert, um letzte Reste des Waschpuffers zu eliminieren. Damit ist das PCR-Produkt von kleinen Primerfragmenten und ungebundenen Nukleotiden befreit. Für das Ziel, die amplifizierten DNA-Produkte wieder aus der Membran zu lösen, wird der Filter in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und mit 30 µl Elutionspuffer versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 3 min (bei Raumtemperatur) wird das Gefäß für 1 min bei 10.000 upm zentrifugiert und das aufgereinigte PCR-Produkt befindet sich im Filtrat.

4.6.4 Sequenzier-PCR

Für die Sequenzier-PCR kommt das ABI BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems zur Anwendung. In diesem Kit befindet sich der sogenannte Premix, in dem alle PCR-Reagenzien (wie Puffer, Polymerase, dNTPs sowie die farbmarkierten ddNTPs) enthalten sind.

Für den Mastermix werden folgende Reagenzien in 0,2 ml Reaktionsgefäße verteilt:

- 4 µl Premix
- 2 µl Einzelprimer, 1 µM
- 6-10 µl HPLC-H₂O

Anschließend werden 4-8 µl aufgereinigtes Amplifikat hinzugegeben. Die Menge des Amplifikats richtet sich nach der Qualität der Bande auf dem Agarosegel. Hieraus ergibt sich ein Reaktionsvolumen von 20 µl. Insgesamt durchläuft diese PCR 25 Zyklen mit dem Temperaturprofil aus Tabelle 16.

Tab. 16: Temperaturprofil für die Cycle-Sequencing-PCR.

25 Zyklen			
Denaturierung	Annealing und Extension	Extension	
95 °C 30 sek	60 °C 4 min	60 °C 1 sek	18 °C ∞

4.6.5 Aufreinigung mittels Dye Ex Kit

Nach der Sequenzierungs-PCR müssen alle ungebundenen farbmarkierten ddNTPs aus dem PCR-Produkt entfernt werden. Dafür wird in dieser Arbeit das Dye Ex Kit von QIAGEN genutzt.

In diesem Kit befinden sich Säulchen, die eine gelförmige Substanz enthalten. Die Säulchen werden vor der Benutzung kurz gevortext. Damit bei der Zentrifugation kein Vakuum entsteht, wird der Deckel um $\frac{1}{4}$ aufgedreht und das untere Ende des Säulchen abgeknickt. Danach werden die benötigten Säulchen in ein Reaktionsgefäß gesetzt und 3 min bei 3.000 upm zentrifugiert. Es entsteht eine schräge Fläche in dem Säulchen. Nach dem Überführen des Säulchens in ein neues Reaktionsgefäß wird das gesamte Sequenzierprodukt auf die schräge Oberfläche mittig pipettiert. Dabei ist darauf zu achten, dass die Schräge bei der erneuten Zentrifugation für 3 min bei 3.000 upm richtig eingesetzt wird. Das aufgereinigte PCR-Produkt befindet sich im Filtrat und der Filter wird verworfen.

4.6.6 Sequenzierung mittels Kapillarelektrophorese

Da die gebundenen ddNTPs farbmarkiert sind, ist eine Auftrennung der entstandenen Fragmente durch eine Kapillarelektrophorese möglich.

Für die Sequenzierung werden 16 µl Formamid und 4 µl PCR-Produkt zusammen in die 0,5 ml Genetic Analyzer Sample Tubes verteilt. Die Gefäße werden mit einem Gummisepta verschlossen. Die Sequenzierung wird gemäß der Herstellerangaben mit POP 4 Polymer vollzogen.

Die Daten werden mit der Sequencing Analysis 3.4.1 Software ausgewertet und manuell mit der Cambridge-Sequenz [Anderson et al. 1981] verglichen.

4.7 SNP Analyse

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden zwei SNP-PCRs entwickelt, die für den Nachweis der häufigsten mitochondrialen Haplogruppen in Westeuropa von Nutzen sind. Die erste SNP-PCR fungiert zum Nachweis der Unterhaplogruppen von der Haplogruppe H, welcher ca. 40 % aller Westeuropäer zuzurechnen sind. Die zweite PCR dient der Einteilung in die neun häufigsten europäisch mitochondrialen Haplogruppen.

Alle ausgewählten SNPs liegen im kodierenden Bereich des mitochondrialen Genoms.

4.7.1 SNP Auswahl für die Untergruppen der Haplogruppe H

Insgesamt können mit dieser neu etablierten SNP-Analyse 15 Untergruppen der Haplogruppe H identifiziert werden. Alle Primersequenzen für die Amplifikations-PCR, als auch für die SNaPshot-PCR, wurden aus verschiedenen Veröffentlichungen entnommen, da diese bereits gut etabliert waren. In Abbildung 10 sind die verwendeten SNPs mit den damit detektierbaren Haplogruppe H Untergruppen dargestellt.

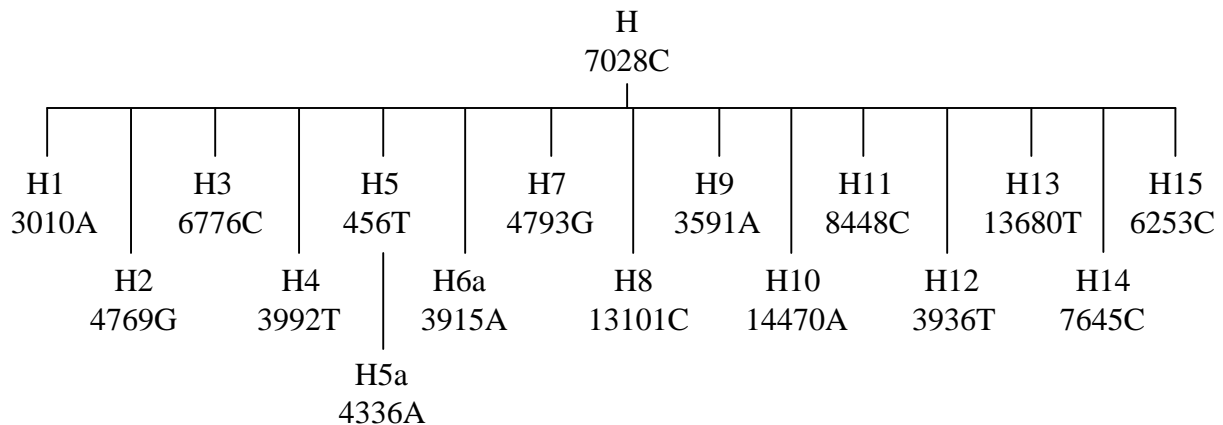


Abb. 10: Darstellung der mitochondrialen Haplogruppe H mit den untersuchten Unterhaplogruppen und deren charakteristischen SNPs.

Die Primersequenzen für die SNPs 7028, 3010, 3915, 3936, 3992, 4336, 4769, 4793 und 6776 wurden aus der Veröffentlichung von Quintans et al. [2004] entnommen. Dabei werden die SNPs 3936, 3992 und 3915 sowie die SNPs 4769 und 4793 gemeinsam in jeweils einem Fragment in der Amplifikations-PCR amplifiziert. Dies ist möglich, weil die SNPs sehr eng auf dem mitochondrialen Genom zusammenliegen und so die amplifizierten Fragmente immer noch recht klein sind.

Die Primersequenzen für die SNPs 456, 3591, 6253, 7645, 8448, 13680 und 14470 wurden von Frau PD Dr. Micaela Poetsch (Institut für Rechtsmedizin, Essen) zur Verfügung gestellt und bisher nicht veröffentlicht.

Die Primersequenzen für SNP 13101 wurden aus der Veröffentlichung von Brandstätter et al. [2006] entnommen. Da in der SNP-Analyse in diesem Fragment noch weitere Primer liegen, ist das Fragment für diesen SNP relativ groß. Ebenfalls aus dieser Veröffentlichung wurde die Extensionsprimersequenz für 3915 genutzt, jedoch um 20 bp gekürzt, so dass diese besser in die Multiplex passt. Alle verwendeten Primersequenzen sowie ihre Konzentrationen sind in Tabelle 17 und 18 aufgeführt.

Tab. 17: Primersequenzen und entgültige Konzentrationen für die Amplifikations-PCR zum Nachweis der Haplogruppe H Untergruppen.

SNP	Primersequenz	Fragment- größe	Konzentr.
7028*	F: 5` CAC CGT AGG TGG CCT GAC TGG C 3` R: 5` GTG TAG CCT GAG AAT AGG GG 3`	168 bp	0,4 µM
3010*	F: 5` CAA TAA CTT GAC CAA CGG AAC A 3` R: 5` CGG TCT GAA CTC AGA TCA CGT A 3`	180 bp	0,1 µM
4793 + 4769*	F: 5` CCG GAC AAT GAA CCA TAA CC 3` R: 5` TGG GTA ACC TCT GGG ACT CA 3`	118 bp	0,1 µM
6776*	F: 5` GCT TCC TAG GGT TTA TCG TGT G 3` R: 5` GAG TGT GGC GAG TCA GCT AAA 3`	140 bp	0,01 µM
4336*	F: 5` GGA GCT TAA ACC CCC TTA TTT 3` R: 5` GAT AGG TGG CAC GGA GAA TTT 3`	80 bp	0,5 µM
3936 + 3992 + 3915*	F: 5` TAG CAG AGA CCA ACC GAA CC 3` R: 5` GAA GAT TGT AGT GGT GAG GGT GT 3`	158 bp	0,3 µM
3936 + 3992 *	F: 5` TAG CAG AGA CCA ACC GAA CC 3` R: 5` GAA GAT TGT AGT GGT GAG GGT GT 3`	158 bp	0,3 µM
13101 [#]	F: 5`CCAAA CATTA ATCAG TTCTT CAAAT ATCTA CTATCTT 3` R: 5` CTTGA AGTGG AGAAG GCTAC GATTT TTTT 3`	589 bp	0,1 µM
456°	F: 5` CCA GCC TAA CCA GAT TTC AAA 3` R: 5` CGG GGG TTG TAT TGA TGA GAT 3`	122 bp	0,5 µM
3591°	F: 5` TTA GCT CTC ACC ATC GCT CTT 3` R: 5` TCA GAG GAT TGA GTA AAC GGC 3`	125 bp	0,2 µM
14470°	F: 5` ACA CTC ACC AAG ACC TCA ACC 3` R: 5` TCT GAA TTT TGG GGG AGG TT 3`	149 bp	0,6 µM
8448°	F: 5` TAC CGT ATG GCC CAC CAT AAT 3` R: 5` TTT TTA TGG GCT TTG GTG AG 3`	112 bp	0,4 µM
13680°	F: 5` TAA CAG GTC AAC CTC GCT TCC 3` R: 5` GAA ATC CTG CGA ATA GGC TT 3`	107 bp	0,2 µM
7645°	F: 5` ATC TTA ATG GCA CAT GCA GC 3` R: 5` TTA GGA AAA GGG CAT ACA GGA 3`	138 bp	0,5 µM
6253°	F: 5` GTT TCC CCG CAT AAA CAA CA 3` R: 5` TTA GGT CTA CGG AGG CTC CA 3`	157 bp	0,15 µM
* Quintans et al. [2004], ° Poetsch [pers. Mitteilung], [#] Brandstätter et al. [2006]			

Tab. 18: Primersequenzen und entgültige Konzentrationen für die Extension-PCR zum Nachweis der Haplogruppe H Untergruppen.

SNP	Primersequenz	Basenwechsel	Konzentr.
7028*	5` TAC ACG ACA CGT ACT ACG TTG TAG C 3`	C – T	0,5 µM
3010*	5` CAC GAC GTT GGA TCA GGA CAT CCC 3`	G – A	0,15 µM
4769*	5` GACTG ACTGA CTGGG CTATT CCTAG TTTTA TTGCT ATAGC 3`	A – G	0,2 µM
6776*	5` [ACTG] ₅ CGT GTG TCT ACG TCT ATT CCT ACT GTA AAT AT 3`	T – C	0,15 µM
3992*	5` [TGAC] ₅ TCC CTA TTC TTC ATA GCC GAA TAC A 3`	C – T	0,5 µM
456°	5` GAC TGA CTG ACC CAA CTA ACA CAT TAT TTT 3`	C – T	0,5 µM
4336*	5` [CTGA] ₇ CTG CTT AAA CCC CCT TAT TTC TAG GAC 3`	T – C	0,5 µM
3915 [#]	5` TTTGT ATTCG ATGTT GAAGC CTGAG ACTAG TTCGG ACTC3`	G – A	0,3 µM
4793*	5` [GACT] ₇ GAA CTC AGA AGT GAA AGG GGG C 3`	A – G	0,5 µM
13101 [#]	5` [T] ₃₃ GTG GAA GCG GAT GAG TAA GAA GAT TCC3`	A – C	0,15 µM
3591°	5` GAC TGA CTG ACT CCC CAT ACC CAA CCC CCT 3`	G – A	0,3 µM
14470°	5` [GACT] ₅ GGG AAT GAT GGT TGT CTT TGG 3`	T – A	0,6 µM
8448°	5` [GACT] ₃ CCT CAT CAC CCA ACT AAA AA 3`	T – C	0,5 µM
3936°	5` [GACT] ₄ GAG TCC GAA CTA GTC TCA GG 3`	C – T	0,5 µM
13680°	5` [GACT] ₃ GAC TTT AAT GGG GTT TAG TAG GGT 3`	C – T	0,3 µM
7645°	5` [GACT] ₃ GCG TGA TCA TGA AAG GTG AT 3`	T – C	0,5 µM
6253°	5` GAC TGA TAC TCC TGC TCG CAT CTG CTA 3`	T – C	0,15 µM
* Quintans et al. [2004], ° Poetsch [pers. Mitteilung], [#] Brandstätter et al. [2006]			

Generell wurde bei der Auswahl der Primer versucht, darauf zu achten, dass die Fragmente für die Amplifikations-PCR unter 200 bp liegen, damit auch stark degradierte mitochondriale DNA bzw. sehr geringe Mengen an DNA noch analysiert werden können.

Alle Primer für die Untergruppen der H-Haplogruppe wurden zunächst bei der Firma Roth und später bei der Firma Biomers bestellt und lyophilisiert geliefert. Nach der Zugabe einer definierten Menge an HPLC-Wasser lagen alle Primer in einer Konzentration von 100 pmol/µl vor.

4.7.2 SNP Auswahl für die Einteilung der westeuropäischen Haplogruppen

Für die Etablierung dieser PCR wurde die Veröffentlichung von Brandstätter et al. [2003] als Grundlage genutzt. Mit der dort vorgestellten Auswahl an SNPs können die Haplogruppen H sowie deren Untergruppen H1 und H3 und die Haplogruppen V, I, X, K, U, J, T und W bestimmt werden (siehe Abbildung 11 und Tabelle 19). In dieser Arbeit wurden einige dieser

Primer nicht benutzt, weil beispielsweise die Gruppe H3 in der ersten entwickelten PCR schon nachgewiesen wurde.

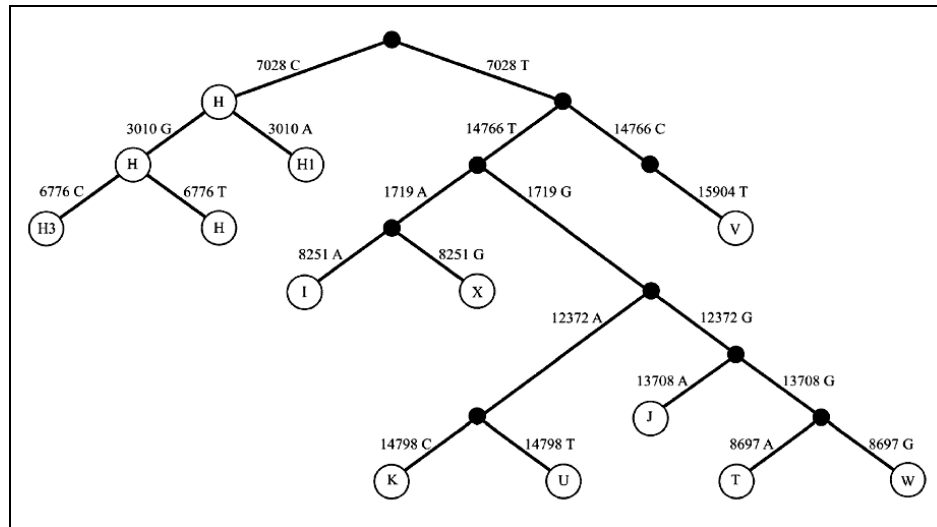


Abb. 11: Aufzweigung der SNPs für die mitochondriale Haplogruppenbestimmung.

[aus: Brandstätter et al. 2003]

Tab. 19: Sequenzpolymorphismen der unterschiedlichen mitochondrialen Haplogruppen.

In der ersten Spalte sind die Varianten der Cambridge-Sequenz angegeben. Nukleotidunterschiede zur rCRS sind fett gedruckt in den anderen Spalten mit den Profilen der jeweiligen mtDNA Haplogruppe [aus: Brandstätter et al. 2003 und Quintans et al. 2004, mod.].

	H	H1	I	J	K	T	U	V	W	X	Pre-V
1719G	G	G	A	G	G	G	G	G	G	A	G
3010G	G	A	G	A	G	G	G	G	G	G	G
7028C	C	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T
8251G	G	G	A	G	G	G	G	G	A	G	G
8697G	G	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G
12372G	G	G	G	G	A	G	A	G	G	G	G
13708G	G	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G
14766C	C	C	T	T	T	T	T	C	T	T	C
14798T	T	T	T	C	C	T	T	T	T	T	T
15904C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C

Die Primersequenzen der Amplifikations-PCR für die SNPs 1719, 8251, 8697, 12372, 13708, 14766, 14798 und 15904 wurden aus der Veröffentlichung von Brandstätter et al. [2003] entnommen. Die Sequenzen für die SNPs 7028 und 3010 sind von Quintans et al. [2004], die schon in der ersten PCR zur Anwendung kamen.

Die Extensionsprimer stammen ebenfalls von Brandstätter et al. [2003]; außer die Sequenzen für die SNPs 7028 und 3010, die aus der Literaturquelle von Quintans et al. [2004] entnommen wurden. Allerdings erfolgte in den meisten Fällen eine Kürzung der Primer, da in dieser Arbeit die SNPs in einer Multiplex-PCR amplifiziert werden und bei Brandstätter et al. [2003] zwei Multiplex-PCRs zur Anwendung kamen. Alle letztendlich verwendeten Sequenzen der Primer und die eingesetzten Konzentrationen sind in Tabelle 20 und 21 wiedergegeben.

Tab. 20: Primersequenzen und endgültige Konzentrationen für die Amplifikations-PCR zum Nachweis der westeuropäischen Haplogruppen.

SNP	Primersequenz	Fragment- größe	Konzentration
1719 [#]	F: 5` CTAAA CCTAG CCCCA AACCC ACTCC AC 3` R: 5` CAGGT TTCAA TTTCT ATCGC CTATA CTTTA TTTGG GT 3`	96 bp	0,02 µM
3010*	F: 5` CAA TAA CTT GAC CAA CGG AAC A 3` R: 5` CGG TCT GAA CTC AGA TCA CGT A 3`	180 bp	0,1 µM
7028*	F: 5` CAC CGT AGG TGG CCT GAC TGG C 3` R: 5` GTG TAG CCT GAG AAT AGG GG 3`	168 bp	0,4 µM
8251 [#]	F: 5` CCACA GTTTC ATGCC CATCG TCCTA G 3` R: 5` CTCTA GAGGG GGTAG AGGGG GTGCT ATAGG 3`	99 bp	0,4 µM
8697 [#]	F: 5` AACAA CCGAC TAATC ACCAC CCAAC AATG 3` R: 5` GAGAT CAGGT TCGTC CTTTA GTGTT GTGTA TGG 3`	94 bp	0,2µM
12372 [#]	F: 5` TGCAA CTCCA AATAA AAGTA ATAAC CATGC ACA 3` R: 5` GGGTT AACGA GGGTG GTAAG GATGG G 3`	97 bp	0,02 µM
13708 [#]	F: 5` ACCCT TACTA ACATT AACGA AAATA ACCCC ACCCT 3` R: 5` AAATC CTGCG AATAG GCTTC CGGCT 3`	84 bp	0,02 µM
14766+ 14798 [#]	F: 5` ATCGT TGTAT TTCAA CTACA AGAAC ACCAA TGACC 3` R: 5` CGAAG TTTCA TCATG CGGAG ATGTT GG 3`	129 bp	0,024 µM
15904 [#]	F: 5` CCCTA ATTGA AAACA AAATA CTCAA ATGGG CC 3` R: 5` AGGTT TTCAT CTCCG GTTCA CAAGA CTGGT G3`	86 bp	0,1µM
# Brandstätter et al. [2003], * Quintans et al. [2004]			

Tab. 21: Primersequenzen und die endgültige Konzentrationen für die Extension-PCR zum Nachweis der westeuropäischen Haplogruppen.

SNP	Primersequenz	Basenwechsel	Konzentr.
1719 [#]	5` GACGA CTCCA CCTTA CTACC AGACA ACCTT A 3`	G – A	0,03 µM
3010*	5` [ACTG] ₆ CTCGA TGTTG GATCA GGACA TCCC 3`	G – A	0,3 µM
7028*	5` [ACTG] ₃ TACAC GACAC GTACT ACGTT GTAGC 3`	C – T	0,5 µM
8251 [#]	5` [GACT] ₅ GGGTG CTATA GGGTA AATAC GGG 3`	G – A	0,05 µM
8697 [#]	5` GAC[GACT] ₅ CGTCC TTTAG TGTTG TGTAT GGTTAT 3`	G – A	0,05 µM
12372 [#]	5` [GACT] ₄ CACAC TACTA TAACC ACCCT AACCC T 3`	G – A	0,02 µM
13708 [#]	5` TAA ACC CCA TTA AAC GCC TG 3`	G – A	0,02 µM
14766 [#]	5` GAA ATG ACC CCA ATA CGC AAA A 3`	C – T	0,0714 µM
14798 [#]	5` CCC CTA ATA AAA TTA ATT AAC CAC TCA 3`	T – C	0,0714 µM
15904 [#]	5` G[GACT] ₃ CCGGT TTACA AGACT GGTGT ATTA 3`	C – T	0,02 µM
# Brandstätter et al. [2003], * Quintans et al. [2004]			

Bei der Auswahl der Primer wurde von Brandstätter et al. [2003] beachtet, dass die ausgewählten SNPs keinen direkten Bezug zu Krankheiten hatten. Außer bei SNP G13708A, der laut einer Studie einen leichten Schutzeffekt gegen Parkinson aufweist, sind bis zum Zeitpunkt der Veröffentlichung keine weiteren Krankheiten bekannt, die durch die verwendeten SNPs detektiert werden.

Die ausgewählten kurzen Fragmente liegen alle im Bereich zwischen 84 und 180 bp und sind damit für eine Analyse degradierter Proben oder Proben mit wenig DNA besonders gut geeignet.

4.7.3 Amplifikation der Fragmente in einer Multiplex-PCR

Für die Etablierung der Multiplex-PCR für die SNP-Analyse wurde die Polymerase Immolase und der mitgelieferte Puffer sowie das Magnesium genutzt. Diese Polymerase ist im Labor gut etabliert und für den Einsatz von Multiplex-PCRs geeignet.

Während der Etablierung werden die Primerkonzentrationen angepasst. Sie liegen alle zwischen 0,01 und 0,6 μM . Die genauen endgültigen Werte sind den Tabellen 17 und 20 zu entnehmen. Die Primer in dieser PCR sind nicht farbmarkiert. Diese dienen der künstlichen Vermehrung des DNA-Stückes um den zu untersuchenden SNP.

Für den Mastermix werden folgende Reagenzien zusammenpipettiert und mit einem Volumen von 11,5 μl auf 0,2 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt.

- 1,25 μl Immobuffer 10x, 10 %
- 1,0 μl dNTPs, 200 μM
- 0,5 μl MgCl_2 , 2 mM
- 0,1 μl Immolase, 0,5 units
- Primer (siehe Tab. 17 und 20)
- HPLC- H_2O

Je 1 μl DNA-Lösung wird zum Mastermix hinzugegeben. Abhängig von der Qualität der DNA durchläuft die PCR das (in Tabelle 22) angegebene Temperaturprofil mit 35 bzw. 40 Zyklen. Dieses Grundrezept ist für alle drei PCRs gleich. Sie unterscheiden sich nur durch die eingesetzten Primer. Der Nachweis der Untergruppen von Haplogruppe H ist auf zwei Multiplex-PCRs aufgeteilt. In der ersten PCR werden die Primer für die SNPs 7028, 3010, 4769, 4336, 3915, 13101, 14470, 8448 und 6253 genutzt. Damit kann festgestellt werden, ob die untersuchte Probe überhaupt der Haplogruppe H angehört. In der zweiten PCR sind die Primer für die SNPs 4793, 6776, 3936, 3992, 456, 3591, 13680 und 7645 zu finden. Diese PCR kommt nur zum Einsatz, wenn die Probe laut der ersten PCR in die Haplogruppe H eingeordnet aber dort noch keiner Untergruppe zugeteilt werden konnte.

Tab. 22: Temperaturprofil für die Amplifikation des Fragments mit eingeschlossenem SNP.

	35-40 Zyklen				
Initial Inkubation	Denaturierung	Annealing	Extension	Final Extension	Final Step
95° C 5 min	95° C 1 min	58° C 1 min	72° C 2 min	72° C 30 min	4° C ∞

Das Temperaturprofil für die Amplifikations-PCR wurde ebenso von Frau PD Dr. M. Poetsch zur Verfügung gestellt. Dieses konnte fast ohne Änderung übernommen werden, da auch sie bereits mit den Primern von Quintans et al. [2004] gearbeitet hat. Jedoch wurde die Anfangszeit für die Inkubation auf 5 min reduziert.

4.7.4 Kontrolle der Amplifikate auf einem Polyacrylamid-Gel (PAGE)

Zur Kontrolle der PCR-Produkte aus der Amplifikations-PCR werden alle Proben auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und durch eine Silberfärbung sichtbar. Ein Polyacrylamidgel ist besonders geeignet, doppelsträngige Moleküle zwischen 15 und 300 bp Länge elektrophoretisch aufzutrennen. Deshalb ist es besonders für kleine PCR-Fragmente aus der Amplifizierung geeignet.

Es werden zunächst zwei gleichgroße Glasplatten auf eine gerade Oberfläche platziert. Eine der Glasplatten weist einen gummierten Rand auf, um das Gel später zu umgrenzen und gleichzeitig die Dicke festzulegen. Auf die andere Glasplatte wird mit Hilfe von ein paar Tropfen Wasser eine Gelbondfolie befestigt, die eine hydrophile Seite aufweist, welche zum Gel zeigt.

Zur Fertigung des Gels wird eine Lösung aus 5 ml Aqua bidest und 11 ml Tris-Formiat-Lösung hergestellt. Diese Mischung wird mit einem Magnetstäbchen auf einen Magnetrührer positioniert. Während des Rührvorganges werden 5,7 ml 40 %ige Acrylamidlösung hinzugegeben, welche schon Bisacrylamid im Verhältnis 19:1 enthält. Damit später im Gel eine Lauffront erkennbar ist, werden 80 µl Bromphenolblau hinzugefügt. Um eine Polymerisierung des Gels zu ermöglichen, werden 220 µl Ammoniumpersulfat (10 %) und 22 µl TEMED dazupipettiert. Nachdem alle Reagenzien gut durchmischt sind, wird das Gel auf die Glasplatte mit dem gummierten Rand gegossen und mit der anderen Glasplatte einschließlich der Folie nach unten abgedeckt [„Flaptechnik“, Haas et al. 1994]. So kann kein Sauerstoff mehr an das Gel gelangen und eine Polymerisierung wird verhindert. Jetzt können die kurzen monomeren Acrylamidmoleküle mit den doppelendigen Bisacrylamidquervernetzern unter Bildung von freien Radikalen, die vom Ammoniumpersulfat zur Verfügung gestellt und von TEMED katalysiert werden,

polymerisieren. Dabei bilden sich Ketten von Acrylamidmonomeren, die gelegentlich durch die Bisacrylquervernetzer quervernetzt sind [Martin 1996].

Nachdem das Gel auspolymerisiert ist, wird es aus den Glasplatten gelöst und die Folie mit dem Gel auf die gekühlte Keramikplatte (15 °C) der Elektrophoresestation gelegt. Um die PCR-Produkte auf das Gel pipettieren zu können, werden kleine Probenauftragspapiere zurechtgeschnitten (1:6 für Proben und Leiter) und mit der Faserung in Laufrichtung parallel (ca. 2 cm unter den oberen Rand) auf das Gel positioniert. Im Anschluss werden je 2 µl PCR-Produkt und 2 µl einer kommerziellen Leiter (Hyperladder V von BIOLINE) auf die Probenauftragspapiere pipettiert. Die Elektrodenstreifen (Blottingpads) werden in TB-Ladepuffer getränkt, kurz mit Papierhandtüchern abgetropft und auf die Ränder des Gels gelegt. Auf den Streifen werden die Elektroden befestigt und die Elektrophorese wird gestartet, mit 100 V und 45 mA. Wenn die Lauffront fast die untere Elektrode erreicht hat, kann die Elektrophorese beendet werden.

Zur Sichtbarmachung der Banden im Gel erfolgt im Nachgang eine Silberfärbung. Das Gel wird hierzu in eine Schale auf einen Schüttler postiert. Um die DNA-Fragmente auf dem Gel zu fixieren, wird 1 %ige Salpetersäure für 7 min hinzugefügt und die blaue Linie der Lauffront wird über braun-grün zu gelb verfärbt. Nach der Fixierung erfolgt ein Waschschriff mit Wasser zur Entfernung der Reste der Salpetersäure. Durch Zugabe von 3 %iger, frisch angesetzter, Silbernitratlösung wird das Gel 20 min gefärbt. Anschließend erfolgt ein mindestens dreiminütiger Waschschriff mit Wasser, um Reste des Silbernitrats zu eliminieren. Zur Darstellung der Banden wird eine Entwicklerlösung, bestehend aus 0,28 M Natriumcarbonatlösung und 0,04 % Formaldehyd, hinzugefügt. Die Färbung ist beendet, wenn die gewünschte Intensität der Banden erzielt ist. Verfärbt sich die Lösung gelblich, sollte sie sofort durch frische Entwicklerlösung ausgetauscht werden. Eine Beendigung der Färbung wird erreicht, indem wieder mit Wasser gespült und dann 10 %ige Essigsäure (für 5 min) zugefügt wird. Anschließend wird mit Wasser für 10 min die restliche Essigsäure entfernt und das Gel über Nacht in 10 % Glycerin gelagert. Hierdurch wird das Gel haltbar und kann aufbewahrt werden. Am nächsten Tag wird das Gel im Geldoc auf einer weißen Platte fotografiert und mit Hilfe von Klebeband auf eine Kopierfolie fixiert. Mit dieser Methode ist das Gel für lange Zeit haltbar.

4.7.5 Aufreinigung mit ExoSAP-IT®

Mit dem Produkt ExoSAP-IT® von USB, bestehend aus Exonuklease I und Shrimp alkalische Phosphatase, ist es möglich, nichtgebundene Nukleotide und Primer aus dem PCR-Produkt zu entfernen. Ohne Verlust an Probe können Fragmente von unter 100 bp bis über 20 kb aufgereinigt werden.

Dafür kommen 5 µl vom PCR-Produkt, mit einem guten Signal auf dem PAGE, und 2 µl Exosap-it in neue 0,2 ml Reaktionsgefäße. Im Anschluss werden die Reaktionsgefäße mit der Mischung in einem Thermocycler für 15 min bei 37 °C inkubiert. Während dieser Zeit werden die freien Nukleotide durch die SAP zerstört und Primer durch die Exonuklease verdaut, die nachfolgende PCRs stören. Durch eine weitere Inkubation von 15 min bei 80 °C wird das Exosap-it inaktiviert und die PCR-Produkte können in die SNP-Analyse eingesetzt werden.

4.7.6 Minisequencing mittels SNaPshot™ Multiplex-Kit

Für das Minisequenzieren bzw. für die sogenannte SnaPshot-PCR kommt das SNaPshot™ Multiplex-Kit von Applied Biosystems zum Einsatz. Die Methode beruht dabei auf einer Primerverlängerung mit nur einem Nukleotid, wie sie in Abbildung 12 schematisch dargestellt ist.

Für diese Methode wird eine Mischung aus den vier möglichen ddNTPs benötigt, die eine unterschiedliche Farbmarkierung aufweisen. Bei dem verwendeten Kit ist Adenin grün markiert mit dR6G, Cytosin ist schwarz mit dTAMRA™, Guanin ist blau mit dR110 und Thymin ist rot mit dROX™ markiert. Durch die unterschiedlichen Markierungen können die einzelnen SNPs später im Elektropherogramm unterschieden werden. Zusätzlich zu den farbmarkierten ddNTPs enthält das Kit einen Puffer und eine Polymerase. Da so die eigenen Primer frei gewählt werden können, ist dieses Kit universell für die SNP-Analyse einsetzbar. [Butler 2005]

Der Extensionsprimer ist so konstruiert, dass er mit seinem 3'-Ende unmittelbar vor dem zu untersuchenden Nukleotid liegt. An den Primer bindet das passende ddNTP und die Verlängerung bricht durch das Fehlen der OH-Gruppe am 3'-Ende des Nukleotids ab.



Abb. 12: Schematische Darstellung der Primerverlängerung mit ddNTPs.
Modifiziert nach Bernat et al. [2002] S. 77.

Auch bei der Minisequenzierung ist es möglich, mehrere SNPs gleichzeitig zu analysieren. Der Extensionsprimer kann an seinem 5'-Ende um eine variable Anzahl von Nukleotiden verlängert werden, so dass jeder Primer sich in seiner Länge von den anderen Primern um einige Nukleotide unterscheidet. Normalerweise wird ein Poly-T-Schwanz an die Primer angehängt, der in der Größenordnung von 3-5 Basen von den anderen abweicht. Somit ist eine adäquate Auftrennung jedes einzelnen SNPs in der Elektrophorese möglich. Daher ist die Farbe des analysierten Signals entscheidend und nicht die Größenposition im Elektropherogramm, welches die Länge des Primers widerspiegelt [Butler 2005].

Für den Mastermix werden 2 µl vom SNaPshot-Reaktionsmix mit den entsprechenden Extensionsprimern vermischt. Die verwendeten Konzentrationen sind den Tabellen 18 und 21 zu entnehmen. Folgend wird der Mastermix auf 6 µl mit HPLC-H₂O aufgefüllt und in 0,2 ml Reaktionsgefäße verteilt. Vom gereinigten PCR-Produkt wird 1 µl eingesetzt, so dass ein Endvolumen von 7 µl entsteht.

Die PCR durchläuft nach Herstellerangaben 25 Zyklen mit dem Temperaturprofil aus Tabelle 23.

Tab. 23: Temperaturprofil für die SNaPshot-PCR nach Herstellerangaben.

25 Zyklen				
Denaturierung	Annealing	Extension	Abschluß Extension	Final Step
96° C 10 sek	50° C 5 sek	60° C 30 sek	60° C 5 sek	20° C ∞

4.7.7 Aufreinigung mittels Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)

Bei der Aufreinigung der PCR-Produkte aus der SNaPshot-PCR kommt die Shrimp alkalische Phosphatase von Promega zur Anwendung. Diese zerstört die ungebundenen ddNTPs im PCR-Produkt. Es werden 0,7 µl SAP direkt auf das PCR-Produkt pipettiert und für 60 min bei 37 °C im Thermocycler inkubiert. Später wird der Thermocycler für 15 min auf 75 °C hochgeheizt und die SAP wird inaktiviert.

4.7.8 SNP-Analyse mittels Kapillarelektrophorese

Für das Sichtbarmachen der fluoreszenzmarkierten gebundenen Nukleotide wird die Kapillarelektrophorese auf dem ABI 310 genutzt. Es werden 1 µl aufgereinigtes PCR-Produkt mit 10 µl Formamid und 0,2 µl LIZ120 Größenstandard in ein Reaktionsgefäß überführt und mit einem Gummisepta verschlossen. Anschließend wird die Elektrophorese nach Herstellerangaben gestartet, wobei die Laufzeit der Probe auf 15 min reduziert wird, weil die Länge der Extensionsprimer kleiner 80 bp beträgt. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe der GeneScan[®] Analysis Software Version 3.1.2.

4.8 Kontaminationsvermeidung und Qualitätssicherung

4.8.1 Allgemeine Bemerkungen

Generell werden alle verwendeten Reaktionsgefäße vor der Benutzung autoklaviert. Alle Arbeitsplätze werden in regelmäßigen Abständen mit DNA-Exitus gereinigt. Vor und nach der Benutzung der Arbeitsflächen werden diese einer Behandlung mit vergälltem Ethanol unterzogen und wenn möglich mit UV-Licht (254 nm, über eine Stunde) bestrahlt. Sowohl für die Extraktion als auch für die PCRs werden gestopfte Pipettenspitzen verwendet.

Die Extraktion wurde getrennt von den PCR-Methoden in einem separaten Laborraum durchgeführt.

Während der einzelnen Arbeitsschritte werden Kittel und Einmalhandschuhe getragen. Zusätzlich wird ein Mundschutz bei der Knochenaufarbeitung und Extraktion verwendet.

Die Vermeidung von Kontaminationen erfolgt in Anlehnung an die Richtlinien der DNA-Kommission der internationalen Gesellschaft für forensische Genetik [Bär et al. 2000, Carracedo et al. 2000].

4.8.2 Qualitätssicherung durch Negativkontrollen

Für die Überprüfung der eingesetzten Reagenzien und Reaktionsgefäße werden Negativkontrollen, sowohl während der Extraktion als auch während der PCR, mitgeführt. Bei der Extraktion mit dem Invisorb Forensic Kit laufen die Negativkontrollen ab dem Lysisschritt mit. Die Negativkontrollen bei der Extraktion mit dem Invisorb Spin Forensic Kit werden bereits während des EDTA-Schrittes eingesetzt. Hier wird in die Gefäße nur EDTA zugegeben und nach der Inkubation das EDTA verworfen. Da noch Reste im Gefäß waren,

hätten eventuelle Kontaminationen trotzdem aufgedeckt werden können. PCR-Negativkontrollen bestehen aus den gleichen Reagenzien wie die anderen Proben. Allerdings wird statt Proben-DNA die entsprechende Menge an HPLC-H₂O hinzupipettiert.

Wenn die Negativkontrollen in den PCRs Signale zeigen, werden die Proben nicht mit in die Analyse einbezogen und die gesamte PCR wird wiederholt. Bei positiven Extraktionsnegativkontrollen werden die positiven Proben, wenn noch genügend Material vorhanden ist, erneut extrahiert. Proben, die nicht erneut extrahiert werden konnten, werden als negativ gewertet und gehen nicht in weitere Analysen ein.

Auf Positivkontrollen wird während der Extraktion verzichtet, da es für Arbeiten mit aDNA nicht empfohlen wird [Poinar 2003, Willerslev & Cooper 2005]. In der PCR wird verdünnte DNA-Lösung von Mitarbeitern mit bekannten Profilen eingesetzt und immer als letztes pipettiert, wenn alle anderen Gefäße schon verschlossen sind.

4.8.3 Mitarbeiter

Um eine Kontamination durch das Personal zu erkennen, wird von allen Mitarbeitern aus dem DNA-Labor und aus dem Sektionsbereich im Institut für Rechtsmedizin Kiel eine Blutprobe entnommen und ein DNA-Profil erstellt. Auch alle Praktikanten, Famulanten usw. müssen eine Blutprobe für einen genetischen Fingerabdruck abgeben, bevor sie im DNA-Labor arbeiten können. Die Mitarbeiter, die die Urnen geöffnet hatten, konnten leider nicht beprobt werden, da nicht mehr zu rekonstruieren war, welcher Personenkreis an den Leichenbränden tätig war.

Im Labor werden durchgängig Laborkittel und Einmalhandschuhe getragen. Zwischen den einzelnen Laborräumen werden die Kittel gewechselt, so dass kein Kittel aus dem Extraktionsbereich in den PCR-Bereich gelangen kann. Bei der Zerkleinerung der Knochen werden die Handschuhe nach jedem Durchgang gewechselt, damit keine DNA von Knochen zu Knochen übertragen wird. Bei der Extraktion werden die Handschuhe regelmäßig ausgetauscht, insbesondere beim Abnehmen von Flüssigkeiten aus den Gefäßen. So soll eine Kreuzkontamination vermieden werden, die unter Umständen nicht in der Extraktionsnegativkontrolle sichtbar wäre.

5 Ergebnisse

5.1 Etablierung der SNP-Analyse

5.1.1 Etablierung der Rahmenbedingungen der SNP-Analyse

Bei der Etablierung der SNP-Analyse erfolgte zunächst eine Austestung des SNaPshot-Kits. Dafür wurden die mitgelieferten Kontrollprimer und die Kontroll-DNA nach Herstellerangaben eingesetzt und amplifiziert. Gleichzeitig konnten mit diesen Proben auch die neu installierte Matrix und der Standard im ABI 310 überprüft werden. Mit den neuen Einstellungen gelang erfolgreich die Analyse des gewünschten Profils und der Nachweis über die Funktionsfähigkeit des Kits wurde somit erbracht.

Da im Handbuch des SNaPshot-Kits mehrere Anleitungen über die Zusammensetzung des Mastermixes für die Fragmentanalyse aufgelistet sind, wurden sie alle ausgetestet. Die einzelnen Austestungen sind der Tabelle 24 zu entnehmen.

Tab. 24: Übersicht der ausgetesteten Ansätze für die Fragmentanalyse zum Nachweis der SNPs.

Ansatz	Formamid	Liz 120	DNA-Menge	Auswertung
1	9 µl	0,5 µl	0,5 µl	Standard teilweise zu groß, einige Signale zu klein
2	6 µl	2 µl	2 µl	Standard und Signale zu groß
3	10 µl	0,2 µl	1 µl	Standard und Signale in Ordnung

Alle drei Ansätze haben gut funktioniert. Der dritte Ansatz zeigte die besten Ergebnisse und verbrauchte am wenigsten Standard. Daraufhin wurde für alle weiteren Analysen immer diese Zusammensetzung des Mastermixes gewählt.

Zusätzlich erfolgte eine Gegenüberstellung der Aufreinigung der SNaPshot-PCR-Produkte mit SAP und mit dem Dye Ex Kit. Dabei zeigte sich kein gravierender Unterschied (siehe Abb.13) und deshalb wurde SAP zur weiteren Anwendung gewählt. Die SAP-Aufreinigung ist leichter in der Handhabung, verbraucht weniger Einwegmaterial und ist wesentlich kostengünstiger als das Dye Ex Kit.

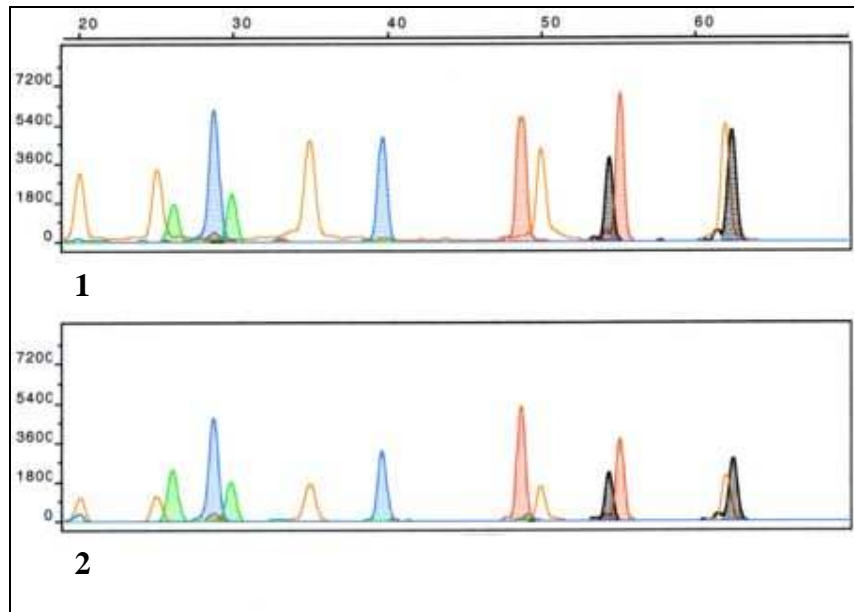


Abb. 13: Darstellung zweier Elektropherogramme der Kontroll-DNA des SNaPshot-Kits nach unterschiedlicher Aufreinigung.

Elektropherogramme nach automatischer Fragmentanalyse. 1: Kontroll-DNA aufgereinigt mit Dye Ex Kit, 2: Kontroll-DNA aufgereinigt mit SAP.

5.1.2 SNP-Analyse für die Haplogruppe H Untergruppen

5.1.2.1 Entwicklung der SNP-PCR für die Haplogruppe H Untergruppen

Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit der einzelnen Primer wurden alle zunächst separat getestet. Dadurch gelang auch eine Feststellung der genauen Basenpaargröße nach der Elektrophorese. Durch die unterschiedlichen Farbmarkierungen der gebundenen ddNTPs können sich leichte Abweichungen von der Primergröße ergeben.

Als Ausgangskonzentrationen der Primer dienten die angegebenen Werte von Frau PD Dr. M. Poetsch (siehe Tab. A3 im Anhang). Die DNA von sieben Mitarbeitern des Institutes, welche sich in ihrer Sequenzierung der HVI und HVII Region unterschieden, wurde als Proben-DNA eingesetzt. Damit sollte sichergestellt werden, möglichst beide Varianten eines SNPs zu amplifizieren.

Mit allen Primern gelang es Signale zu detektieren. Jedoch lieferten viele Signale ein sehr unruhiges Bild im Elektropherogramm (siehe Tab. A3 im Anhang). Daraufhin wurden einige Extensionsprimer mit der gleichen Sequenz, aber HPLC gereinigt, von der Firma Biomers bezogen. Diese zeigten meist ein deutlicheres Signal und fanden deswegen in den Multiplex-PCRs Anwendung. Besonders deutlich wurde dies bei SNP 6776. Beim ersten Durchlauf des SNPs mit den Primern der Firma Roth zeigte dieser ein sehr großes Signal mit vielen Farbartefakten. Mit einer 1:10 Verdünnung des Primerpaares in der Amplifikations-PCR gelang die Amplifikation eines kleineren Signals mit Farbartefakten. Bei der Verdünnung

(1:10) der Primer in beiden PCRs konnte nur ein schlecht auswertbares Signal mit vorhandenen Farbartefakten detektiert werden. Mit dem neuen Extensionsprimer von Biomers und den ursprünglichen Ausgangskonzentrationen erfolgte der Nachweis eines großen Signals (über 5.000 rfu) mit sehr schwachen Farbartefakten. Die Ergebnisse dieser Austestung sind in Abbildung 14 dargestellt.

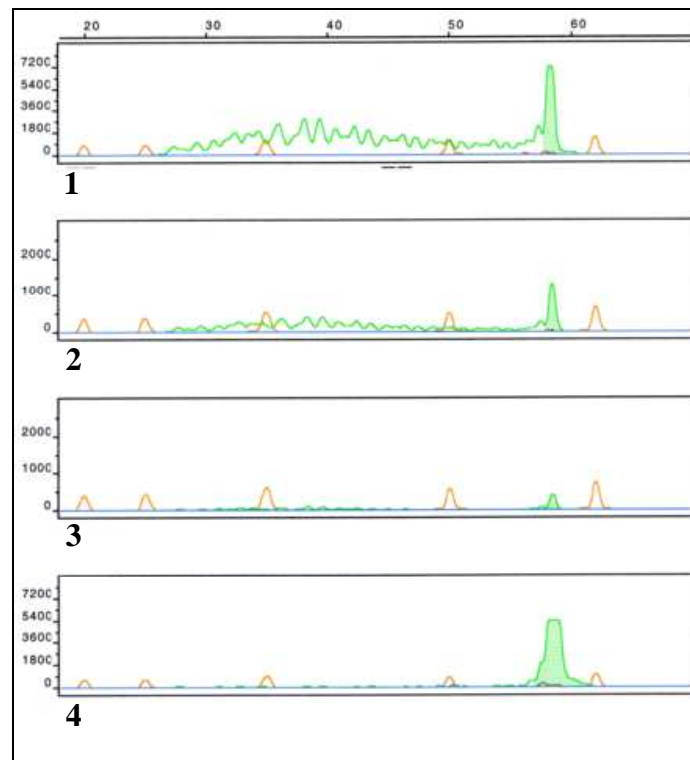


Abb. 14: Darstellung des Signals für SNP 6776 in Abhängigkeit von der Primerkonzentration.

Elektropherogramme nach der Kapillarelektrophorese im ABI 310. **1:** Signal mit dem Extensionsprimer von Roth, **2:** Amplifikationsprimer 1:10 verdünnt, **3:** beide Primer 1:10 verdünnt, **4:** Signal mit neuem Extensionsprimer von Biomers.

Nachdem der Nachweis der Funktionsfähigkeit aller Primer erbracht war, folgte die Austestung der ersten Multiplex-PCR. Die SNPs wurden in zwei Multiplex-PCRs (A und B) entsprechend der Anordnung von Frau PD Dr. M. Poetsch aufgeteilt. Die Konzentrationen für die Primer wurden von den Einzelläufen übernommen. In der Multiplex A liefen folgende SNPs zusammen: 7028, 3010, 4769, 4793, 6776, 3915, 3936, 3992 und 4336. Nach erfolgreicher Analyse der PCR-Produkte stellten sechs der neun SNPs große und eindeutige Signale dar. Der rote Farbbereich lief sehr unruhig und die SNPs 4336, 3936 und 3992 fielen komplett aus. In der Multiplex B liefen die anderen SNPs zusammen: 3591, 6253, 13680, 7645, 456, 8448 und 14470. Nach der Analyse dieser PCR-Produkte konnten alle sieben Signale für die SNPs analysiert werden. Allerdings war der Lauf sehr unruhig, besonders im roten und schwarzen Farbbereich (siehe Abb. 15).

Um die Farbartefakte im Elektropherogramm der Multiplex B zu verringern, wurde die eingesetzte Magnesiummenge in der Amplifikations-PCR von 2 mM auf 1,5 mM reduziert. Durch die Senkung konnten die Artefakte verringert werden und die Konzentration wurde zunächst für beide Multiplex-PCRs beibehalten.

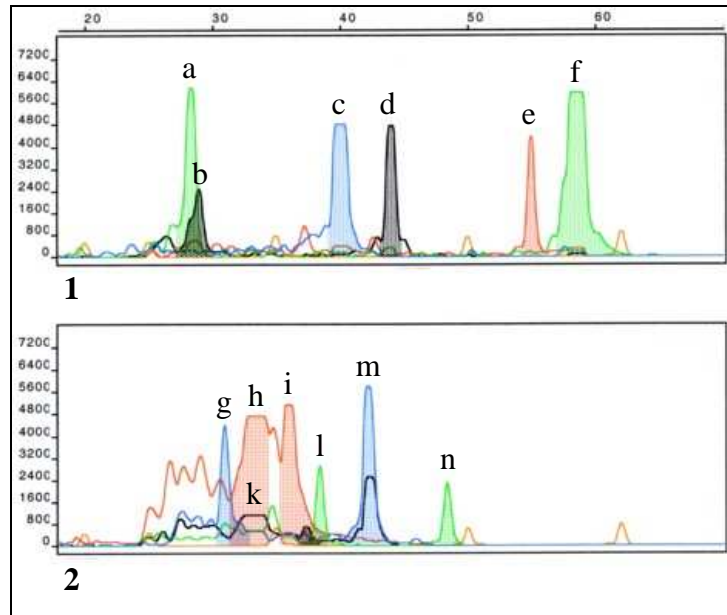


Abb. 15: Multiplex A und B für die 1. Zusammenstellung der Primer.

Elektropherogramme nach Kapillarelektrophorese im Abi 310. 1: Ergebnisse für Multiplex A: a: 3010, b: 7028, c: 3915, d: 4769, e: 4793, f: 6776. 2: Ergebnisse für Multiplex B: g: 3591, h: 6253, i: 8448, k: 456 (schwarz, nicht unterlegt), l: 7645, m: 13680, n: 14470. Die Probe gehört zur Haplogruppe H1.

Bei der Auswertung der beiden Multiplexe stellte sich heraus, dass einige SNPs sich überlagerten. Dies geschieht, wenn die Extensionsprimer eine ähnliche Länge aufweisen und die SNPs die gleichen Nukleotidvariationen und somit die gleiche Farbmarkierung besitzen. Das Resultat ist in Abbildung 15 in der Multiplex B bei den SNPs 6253 (h) und 456 (k) dargestellt. Teilweise lagen die Signale auch so eng beieinander, dass eine eindeutige Zuordnung nur schwer möglich war. Auch die Signalthöhen variierten stark. Deshalb erfolgte eine zweite Zusammenstellung der Primer. Zudem wurden unterschiedliche Konzentrationen der Primer ausprobiert (siehe Tabelle A4 im Anhang).

In der zweiten zusammengestellten Multiplex-PCR A kam es in einigen Proben erneut zu zwei Komplettausfällen der SNPs 3936 und 4336. Andere Proben detektierten ein sehr kleines und damit nicht auswertbares Signal für SNP 3936. Das Signal für den SNP 3992 war im Verhältnis zu den anderen Signalen ebenfalls sehr klein. Andere SNPs zeigten sehr große Signale (über 2.000 rfu) und waren eindeutig auswertbar. Deshalb wurden die Konzentrationen im zweiten Versuch bei den sehr großen Signalen gesenkt und bei den fehlenden Signalen erhöht. Auch in diesem Ansatz fielen die Signale für die SNPs 3936 und 4336 komplett aus. Die großen Signale für die SNPs 3010, 3915 und 6776 waren nicht

wesentlich kleiner als im ersten Versuch. Jedoch amplifizierten beide Versuche für Multiplex A relativ wenig Farbartefakte.

In der Multiplex B konnten alle Signale im ersten Versuch eindeutig abgelesen werden. Die Signale erreichten fast alle die gleiche Höhe. Trotz der neuen Zusammenstellung der SNPs gab es noch immer Farbartefakte im roten Bereich. Diese erschweren die Auswertung, wenn die Primer ein ddTTP binden. Daraufhin wurden in der zweiten Zusammenstellung der Primer auch in der Multiplex B nochmals einige Konzentrationen geändert (siehe Tab. A4 im Anhang). Obwohl die Primerkonzentrationen für SNP 3591 und 13680 keine Änderung erfuhren, detektierten sie deutlich kleinere Signale. Die Signale für die SNPs 7645 und 4793 konnten erfolgreich vergrößert werden. Das Signal für den SNP 4769 reagierte jedoch nicht auf den Konzentrationsunterschied. Die Elektropherogramme sind in Abbildung 16 dargestellt.

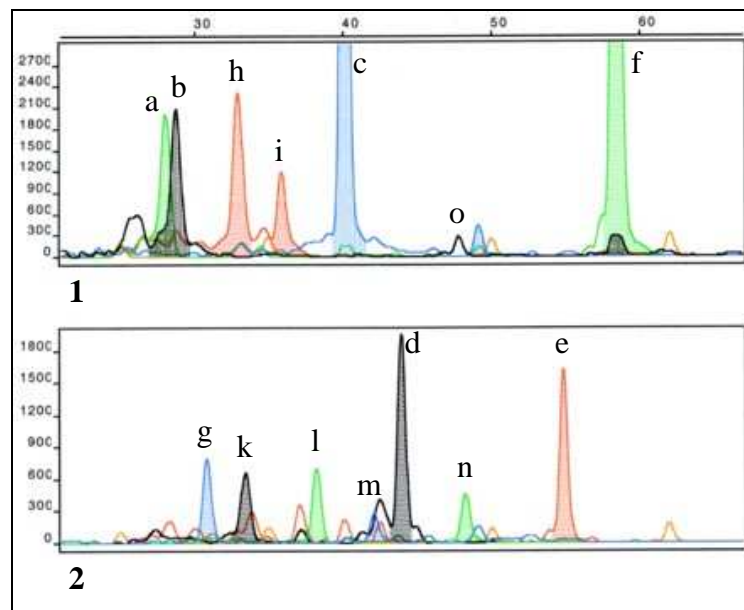


Abb. 16: Multiplex-PCR mit der zweiten Zusammenstellung der SNPs und den Primerkonzentrationen aus dem zweiten Versuch.

Elektropherogramme nach automatischer Fragmentanalyse. 1: Multiplex A: a: 3010, b: 7028, h: 6253, i: 8448, c: 3915, o: 3992 (schwarz nicht unterlegt), f: 6776. 2: Multiplex B: g: 3591, k: 456, l: 7645, m: 13680 (blau), d: 4769, n: 14470, e: 4793. Die Probe gehört zur Haplogruppe H1.

Bei der Auswertung fiel auf, dass besonders die drei SNPs 3915, 3936 und 3992 Schwierigkeiten bereiteten, die mit einem Primerpaar in der Amplifikations-PCR amplifiziert wurden. Daraufhin erfolgte eine dritte Umstellung der Primer, so dass in der SNaPshot-PCR nicht mehrere Extensionsprimer an einem Fragment banden. Auch die SNPs 4769 und 4793 wurden getrennt voneinander amplifiziert, obwohl ihre Signale gut auswertbar waren. Die Konzentrationen der Primer sind unverändert geblieben. In der Multiplex A erfolgte die

Amplifikation der SNPs 7028, 3010, 3915, 4336, 6253, 8448 und 4769. In der Multiplex B waren es die SNPs 3591, 13680, 14470, 6776, 3992, 3936, 456, 7645 und 4793.

In der Multiplex A konnte erstmals ein Signal für SNP 4336 generiert werden. Alle Signale waren vorhanden und eindeutig auswertbar bis auf SNP 7028. Dieser war im Vergleich mit den anderen Signalen relativ klein. Zudem ist eine eindeutige Auswertung nicht möglich, wenn ein ddTTP gebunden wurde. In der Multiplex B gelang der Nachweis eines Signals für den SNP 3936. Dagegen fiel das Signal für SNP 14470 in allen Proben komplett aus. Auch der unruhige Lauf im roten Bereich war noch vorhanden. Alle anderen Signale zeigten auswertbare Signale (siehe Abbildung 17).

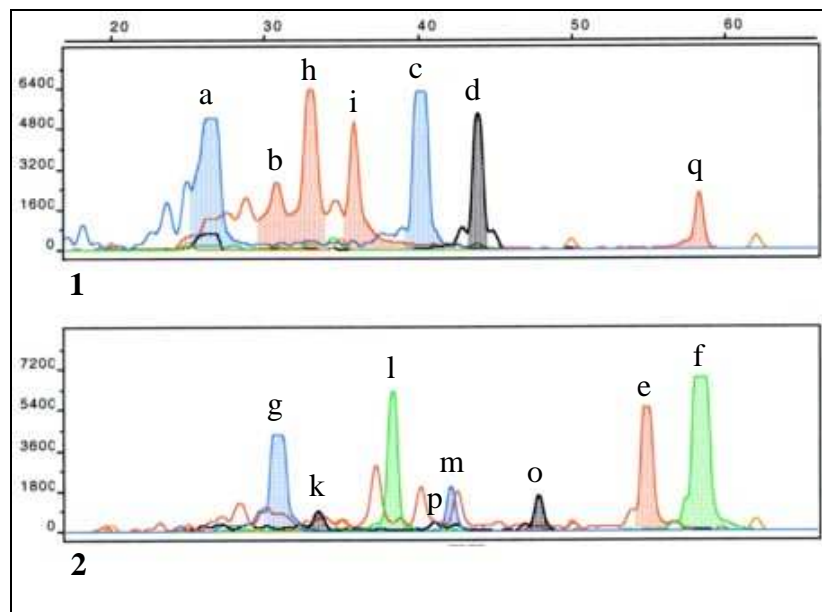


Abb 17: Multiplex-PCR nach der dritten Zusammenstellung der SNPs.

Elektropherogramme nach automatischer Fragmentanalyse. 1: Multiplex A: a: 3010, b: 7028, h: 6253, i: 8448, c: 3915, d: 4769, q: 4336. 2: Multiplex B: g: 3915, k: 456, l: 7645, p: 3936 (schwarz nicht unterlegt), m: 13680, o: 3992, e: 4793, f: 6776. Diese Probe gehört nicht in die Haplogruppe H.

Da das Signal für den SNP 14470 in der Multiplex B nicht funktionierte, wurden die Primer ein viertes Mal umgestellt, so dass der SNP 14470 in Multiplex A nachgewiesen werden konnte. Wie in Tabelle A5 im Anhang zu sehen, wurden anschließend nochmals die Konzentrationen der Primer geändert. In der Multiplex A konnte nach der vierten Umstellung ein kleines Signal für den SNP 14470 generiert werden, worauf die Konzentration nochmals erhöht wurde. Im Anschluss war das Signal gut nachweisbar. Auch die Konzentrationserhöhungen der Primer für die SNPs 7028 und 4336 führten zu eindeutigen Signalen. Insbesondere das Signal für den SNP 7028 war, nach der Änderung, im roten Farbbereich gut abgrenzbar. Die Senkung der Primerkonzentration von SNP 3915 zeigte keinen Erfolg.

In der Multiplex B konnte ebenfalls von allen SNPs ein eindeutiges Signal detektiert werden. Besonders die Konzentrationserhöhungen der Primer für die SNPs 456, 3992 und 3936 führten zu stärkeren Signalen, die eindeutig -von dem sonst unruhigen Verlauf- im roten und schwarzen Farbbereich zu unterscheiden waren (siehe Abbildung 18).

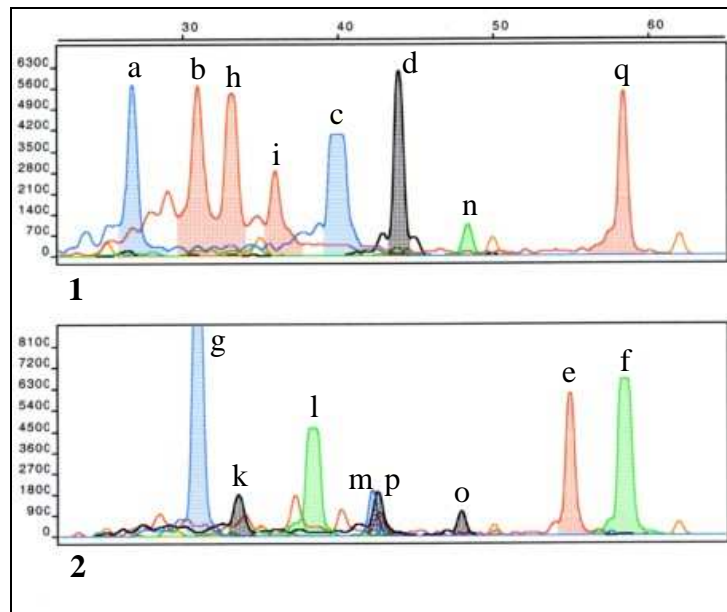


Abb. 18: Multiplex-PCR nach der vierten Zusammenstellung der SNPs mit dem fünften Versuch der Konzentrationsänderung der Primer.

Elektropherogramme nach automatischer Fragmentenanalyse. 1: Multiplex A: a: 3010, b: 7028, h: 6253, i: 8448, c: 3915, d: 4769, n: 14470, q: 4336. 2: Multiplex B: g: 3591, k: 456, l: 7645, m: 13680, p: 3936, o: 3992, e: 4793, f: 6776.

Da bei den ausgewählten SNPs der Nachweis der Haplogruppe H8 fehlte, wurde die entsprechenden Primer für SNP 13101 aus einer Veröffentlichung von Brandstätter et al. [2006] entnommen. Auch diese Primer liefen zunächst einzeln, um die Funktionalität und die genaue Lage des Signals zu überprüfen. Sowohl in der Amplifikations-PCR als auch in der SNaPshot-PCR wurden die Primer mit einer Konzentration von 0,25 μM eingesetzt. Aufgrund der amplifizierten Signalhöhe wurden die Primer in die Multiplex A, mit einer verringerten Primerkonzentration, in die Amplifikations-PCR (0,1 μM) und in die SNaPshot-PCR (0,15 μM) eingesetzt. Eine weitere Anpassung der Konzentrationen war nicht nötig (siehe Abb. 19). Mit Hilfe der Entwicklung dieser zwei Multiplex-PCRs gelang es, aus Probenmaterial die Haplogruppe H mit 15 ihrer Untergruppen nachzuweisen.

5.1.2.2 Etablierung der SNP-PCR für die Untergruppen der Haplogruppe H

Zur Überprüfung der Primer wurden 35 Proben mit bekannten Haplogruppen, aus dem Institut für Rechtsmedizin Essen durch Frau PD Dr. M. Poetsch, zur Verfügung gestellt. Unter diesen Proben waren 18 der Haplogruppe H zuzuordnen, welche die Untergruppen H1, H2, H3, H4,

H5a, H6a, H7 und H11 abdeckten. Auch die Untersuchung dieser Proben mit der neuentwickelten PCR konnte diese Ergebnisse bestätigen. Nur der SNP 3915, der bei der Entwicklung der PCRs immer ein sehr großes Signal im blauen Farbbereich zeigte und kaum auf Konzentrationsänderungen reagierte, detektierte ein falsches Signal beim Einsatz der Kontrollproben. Normalerweise sollte der Extensionsprimer ein ddGTP binden, wenn die DNA der Andersonsequenz entsprach. Wenn die DNA-Probe an der Stelle eine Abweichung zur Vergleichsequenz aufwies und damit zur Gruppe H6a gehört, sollte der Primer ein ddATP binden. Bei den beiden Kontrollproben aus der Gruppe H6a geschah dies nicht, so dass davon ausgegangen werden musste, dass dieser Primer nicht ordnungsgemäß funktionierte.

Aufgrund dieser Ergebnisse kam der Einsatz eines neuen Extensionsprimers zum Einsatz, dessen Sequenz ebenfalls aus der Veröffentlichung von Brandstätter et al. [2006] entnommen wurde. Im Gegensatz zur Originalsequenz wurde dieser Primer um elf Basenpaare gekürzt. Somit war er etwas länger als der alte Primer und band am H-Strang. Um die Funktionalität dieses Primers zu überprüfen, lief er erst einzeln mit den Kontrollproben und einer Konzentration von 0,2 µM. Das Ergebnis zeigte, dass dieser Primer ein eindeutig auswertbares Signal amplifizierte. Anschließend wurde er in die Multiplex A eingesetzt, mit einer Konzentration von 0,3 µM. Da der neue Primer am H-Strang des Fragments band, generierte er statt A-G, wie der alte Primer, ein C-T. Damit war er mit seiner Länge sehr eng am SNP 4769, der sich nur um eine Base in der Länge unterschied. Trotzdem war eine Zuordnung möglich, weil nur einer der beiden SNPs von der Andersonsequenz abweichen konnte. Wenn beide SNPs mit der Andersonsequenz identisch waren, generierten beide ein schwarzes Signal. Dieses Problem konnte auch nicht umgangen werden, wenn der neue Primer für 3915 in die Multiplex B eingebaut wurde, da sich hier der SNP 3936 nur um eine Base unterschieden hätte.

Nachdem der Extensionsprimer für den SNP 3915 ausgetauscht wurde, konnte der Nachweis erbracht werden, dass der Primer und die neue Methode auf die beschriebene Art und Weise erfolgreich funktionierten. Das Elektropherogramm in Abbildung 19 zeigt die endgültige Version der Multiplex A.

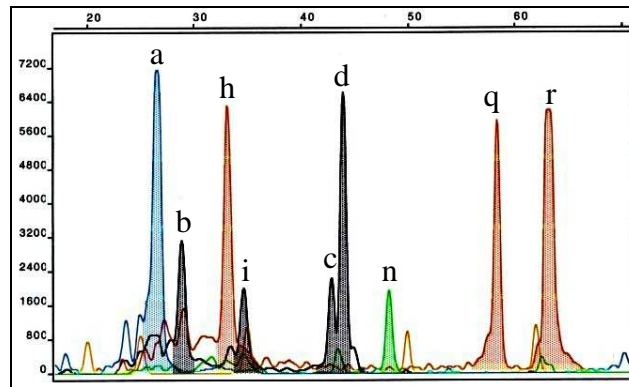


Abb. 19: Multiplex A mit dem SNP 13101 und dem neuen Extensionsprimer von 3915.

Elektropherogramm nach automatischer Fragmentanalyse. a: 3010, b: 7028, h: 6253, i: 8448, c: 3915, d: 4769, n: 14470, q: 4336, r: 13101. Diese Probe entspricht der Haplogruppe H 11, da 7028C und 8448C amplifiziert wurden.

Bei der Testung der neuen SNP-PCR an DNA-Proben, von 41 Mitarbeitern des Instituts für Rechtsmedizin, gelang der Nachweis, dass 20 Personen der Haplogruppe H angehörten. Von diesen 20 Personen waren elf Personen der Haplogruppe H1 zugehörig, und jeweils eine Person der Haplogruppe H4, H6a, H7, H10 und H14. Vier Personen konnten nicht in die Untergruppen eingeteilt werden. Dieser Test war nicht repräsentativ, zeigte aber die Tendenz, dass etwa 40 % der Kaukasier der Haplogruppe H angehören [Allard et al. 2002].

5.1.3 SNP-Analyse für die häufigsten westeuropäischen Haplogruppen

5.1.3.1 Entwicklung der SNP-PCR für die häufigsten westeuropäischen Haplogruppen

Da etwa 60 % der europäischen Bevölkerung nicht der Haplogruppe H angehören und somit nicht deren Untergruppe bestimmt werden kann, wurde eine weitere PCR etabliert, die die neun wichtigsten Haplogruppen nachweist. Als Grundlage für diese PCR diente die Veröffentlichung von Brandstätter et al. [2003]. Mit dieser neuen PCR ist es möglich, die Haplogruppen H, V, I, X, K, U, J, T und W sowie die Untergruppe H1 nachzuweisen.

Da ca. 40 % der westeuropäischen Bevölkerung (getestet wurden Proben aus Tirol) der H-Haplogruppe und von diesen 25 % der Haplogruppe H1 angehören [Brandstätter et al. 2006], ist es sinnvoll, diese Untergruppe mit in die Analyse einzubeziehen. So kann unter Umständen auf die Analyse der Untergruppen verzichtet werden.

Zunächst wurden auch hier alle Primer einzeln getestet, um die korrekte Lage der Signale zu überprüfen. Die Primer für SNP 7028 und 3010 fanden dabei keine Berücksichtigung. Sie wurden aus der ersten PCR übernommen und somit war ihre genaue Länge bekannt. Alle SNPs zeigten klare, große Signale mit den Konzentrationen, die von Brandstätter et al. [2003] vorgegeben worden waren. Allerdings mussten die Extensionsprimer von SNP 7028 und 3010

ebenfalls neu bestellt werden, sonst hätte es mit der vorher verwendeten Länge Überschneidungen zu anderen SNPs gegeben. Auch hier wurde die DNA von verschiedenen Mitarbeitern eingesetzt, die sich in der HVI und HVII Region der mitochondrialen DNA unterschieden.

Daraufhin wurde die erste Multiplex-PCR mit allen Primern, außer für SNP 7028 und 3010, mit den Konzentrationen aus den Einzelläufen ausgetestet. In Abbildung 20 sind die Ergebnisse aller Versuche dargestellt. Die Tabellen A6 und A7 im Anhang zeigen die verwendeten Konzentrationen bei der Etablierung. Im ersten Versuch konnten alle Signale amplifiziert werden. Die Signale waren sehr groß und die SNPs 15904 und 12372 lagen so eng zusammen, dass sie zu einem Signal verschmolzen, wenn beide ein Guanin detektierten.

Daraus resultierend wurden alle Primer mit 0,005 μM in der Amplifikations-PCR eingesetzt. In der SNaPshot-PCR lagen die Primerkonzentrationen bei 0,02 μM . Nach der Elektrophorese stellten sich einige Signale sehr klein dar.

Es zeigte sich, dass besonders die SNPs, welche Cytosin detektierten, sehr klein im Verhältnis zu den anderen waren. Anhand dieser Ergebnisse erfolgte der Konzentrationseinsatz der Primer in beiden PCRs für SNP 8251, 8697 und 14766+14798 erneut pur und die anderen weiterhin 1:10 verdünnt. Jedoch wurden aus den Proben wiederum zu große Signale (über 5.000 rfu) während der Elektrophorese amplifiziert.

Im vierten Versuch konnten die neu generierten Extensionsprimer für SNP 7028 und 3010 zur Anwendung kommen. Außerdem wurden einige Konzentrationen erneut geändert. Nach der Elektrophorese im vierten Versuch waren die Signale für SNP 12372 und SNP 1719 in allen Proben ausgefallen und die anderen Signale variierten in ihrer Größe stark. Besonders klein war das Signal für SNP 8697.

Deshalb wurden die Konzentrationen in einem fünften Versuch nochmals leicht geändert. Mit diesen Veränderungen gelang es, alle Signale einer Farbe in etwa der gleichen Höhe darzustellen, woraufhin die Konzentrationen aus dem fünften Versuch beibehalten wurden.

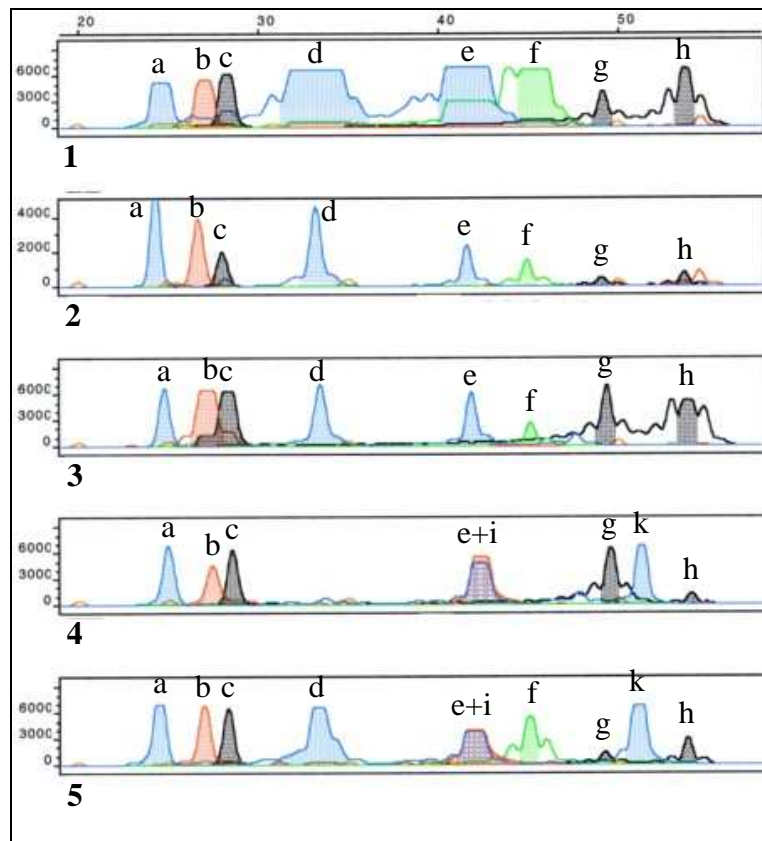


Abb. 20: Entwicklungsschritte der PCR zur Bestimmung der westeuropäischen Haplogruppen.

Elektropherogramme nach Kapillarelektrophorese auf dem ABI 310. **1:** erster Versuch der Multiplex-PCR, **2:** zweiter Versuch (alle Primer 1:10 verdünnt eingesetzt), **3:** dritter Versuch (einige Primerkonzentrationen geändert), **4:** vierter Versuch, **5:** endgültige Anpassung der Primerkonzentrationen. a: 13708, b: 14766, c: 14798, d: 1719, e (blau): 15904, f: 12372, g: 8251, h: 8697, i (rot): 7028, k: 3010. Diese Proben entsprechen der Haplogruppe K.

5.1.3.2 Etablierung der Haplogruppen-PCR

Zur Überprüfung der Funktionalität der verwendeten Primer wurden DNA-Proben mit bekanntem Haplotypen analysiert. Es standen ebenfalls die Kontrollproben aus Essen sowie neue Kontrollproben aus dem Institut für Rechtsmedizin Leipzig zur Verfügung.

Insgesamt gingen 29 Proben in diese Austestung ein, die ausnahmslos zu korrekten, auswertbaren Ergebnissen führten. Durch diese Proben wurden alle in dieser PCR analysierbaren Haplogruppen abgedeckt. Somit war sichergestellt, dass sämtliche Primer fehlerfrei funktionierten. Die typischen Elektropherogramme für einige ausgewählte Haplogruppen sind aus Abbildung 21 ersichtlich.

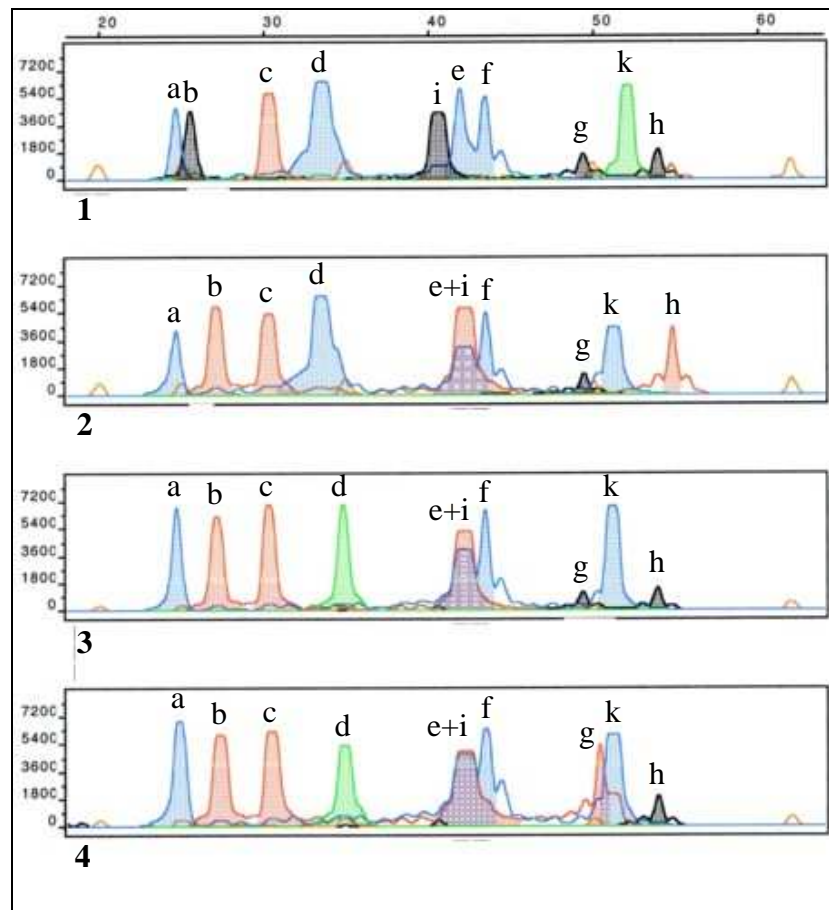


Abb. 21: Darstellung der Multiplex-PCR von vier unterschiedlichen Proben, die verschiedenen Haplogruppen zugeordnet werden können.

Elektropherogramm nach automatischer Fragmentanalyse. **1:** Haplogruppe H1, **2:** Haplogruppe T, **3:** Haplogruppe X, **4:** Haplogruppe I. a: 13708, b: 14766, c: 14798, d: 1719, e (blau): 15904, i (schwarz oder rot): 7028, f: 12372, g: 8251, k: 3010, h: 8697.

5.1.4 Nachweisgrenzen der neu etablierten SNP-PCRs

Für beide SNP-PCRs wurden Nachweisgrenzen detektiert. Als Standard-DNA fungierte die Zelllinie von Promega (Female 232,2 µg/ml). Zunächst erfolgte eine Verdünnung, beginnend mit 1 ng bis 10 fg, in Zehnerpotenzen. Im ersten Versuch konnten bei 10 pg noch alle Signale der SNPs der westeuropäischen Haplogruppen amplifiziert werden. Bei 1 pg kam es zu ersten Ausfällen. Außerdem entstand -ab einer Konzentration von 100 pg- ein Artefakt, welches mit der Abnahme der Konzentration immer größer wurde. Das Artefakt lag im roten Farbbereich in der gleichen Position wie der SNP 8697, wenn Thymin gebunden hat. Jedoch unterdrückte er nicht das Signal bei der Anbindung von Cytosin. Dann waren beide Signale vorhanden, so dass eine sichere Auswertung möglich war.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Magnesiumkonzentration, auch bei den H-Unterhaplogruppen-PCRs, wieder auf die Ursprungskonzentration von 2 mM erhöht. Aufgrund der weiteren Umstellung der Primer in der PCR für die Bestimmung der H-

Untergruppen nach der Senkung der Magnesiumkonzentration, sind die Farbartefakte nicht wieder aufgetreten. Zusätzlich wurden in die Verdünnungsreihe Zwischenschritte eingebaut, um die genauen Grenzen besser abschätzen zu können. In Abbildung 22 ist der Unterschied zwischen den beiden eingesetzten Magnesiumkonzentrationen dargestellt. Bei der geringeren Konzentration von 1,5 mM zeigen sich die Signale deutlich kleiner und einige sind gar nicht vorhanden. Deutlich sichtbar ist das rote Farbartefakt bei der Haplogruppen-PCR.

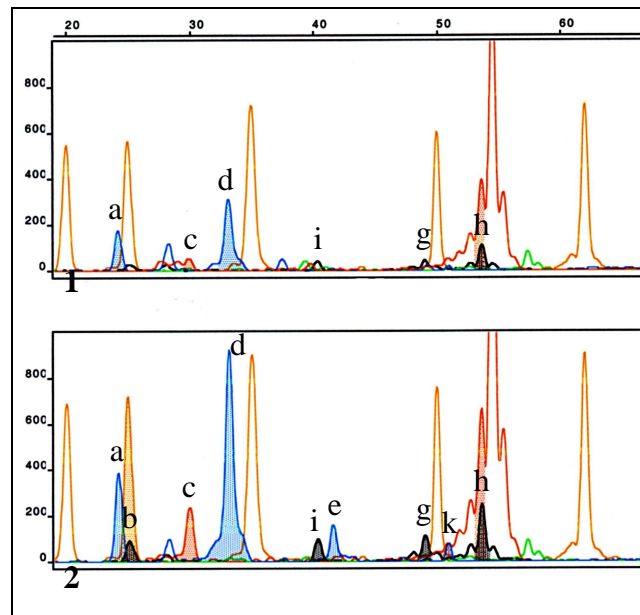


Abb. 22: Multiplex-PCR der westeuropäischen Haplogruppen mit unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen bei einer Zugabe von 3,125 pg DNA.

Elektropherogramm nach automatischer Fragmentanalyse. 1: Magnesiumkonzentration beträgt 1,5 mM. 2: Magnesiumkonzentration erhöht auf 2,0 mM. a: 13708, b (schwarz): 14766, c: 14798, d: 1719, e: 15904, i: 7028, g: 8251, k: 3010, h (schwarz): 8697.

Mit der Magnesiumkonzentrationserhöhung und den Zwischenschritten konnte eine Nachweisgrenze von 500 fg in allen drei PCRs erzielt werden. Teilweise gelang auch der Nachweis von 100 fg. Diese Ergebnisse waren aber nicht reproduzierbar, so dass bei dieser Menge eher ein Teilprofil zu prognostizieren war. Alle Verdünnungsreihen wurden bei 40 Zyklen in der Amplifikations-PCR durchgeführt. Beispielhaft ist die Verdünnungsreihe der Multiplex A zum Nachweis der H-Untergruppen in Abbildung 23 zu erkennen.

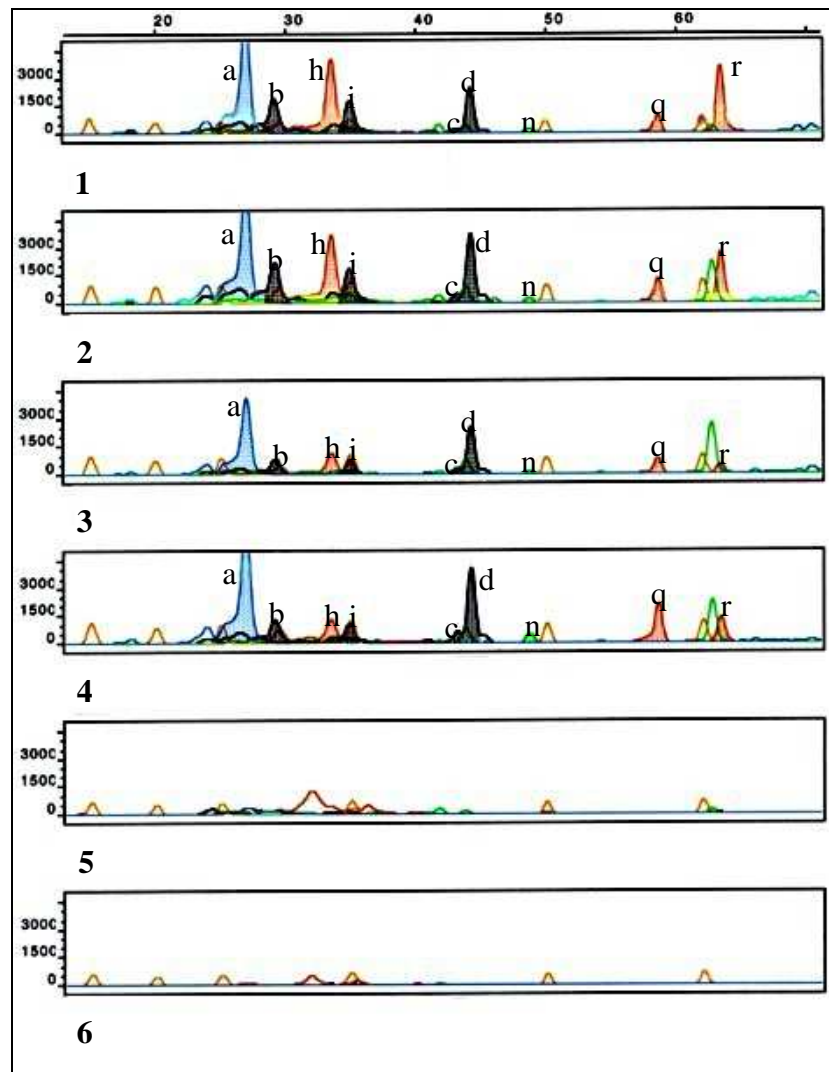


Abb. 23: Multiplex-PCR A zum Nachweis der H-Unterhaplogruppen in einer Verdünnungsreihe mit 40 Zyklen.

Elektropherogramm nach automatischer Fragmentanalyse. **1:** 6,26 pg, **2:** 3,125 pg, **3:** 1pg, **4:** 500 fg, **5:** 100 fg, **6:** negative Kontrolle. a: 3010, b: 7028, h: 6253, i: 8448, c:3915, d:4769, n: 14470, q: 4336, r: 13101. Diese Probe entspricht der Haplogruppe H 11, da 7028C und 8448C amplifiziert wurden.

5.1.5 Vergleich der Effizienz der SNP-Analyse mit anderen Methoden an forensischen Proben

5.1.5.1 Vergleich der SNP-Analyse mit der Screening-PCR

Bei allen untersuchten 145 Proben wurde mittels Screening-PCR festgestellt, ob und wie viel mitochondriale DNA noch in den Proben existent war. Dies war erforderlich, weil das Alter der Proben zum Zeitpunkt der Analyse teilweise bis zu drei Jahre betrug. Bei der Auswertung wurde nur das kleine 280 bp mitochondriale DNA-Fragment berücksichtigt. Dazu erfolgte die Messung der relativen Fluoreszenzeinheiten (rfu) nach der Kapillarelektrophorese und die Einteilung der Proben in fünf Gruppen: Gruppe 0 (32 Proben) = kein detektierbares Signal, Gruppe I (44 Proben) = bis 10.000 rfu, Gruppe II (24 Proben) = 10.000 – 50.000 rfu, Gruppe

III (32 Proben) = 50.000 – 100.000 rfu und Gruppe IV (11 Proben) = über 100.000 rfu. Zum Vergleich mit den SNP-Ergebnissen wurde die Anzahl der erfolgreich analysierten SNPs ausgezählt und den Gruppen der Screening-PCR zugeordnet. Die Abbildung 24 zeigt die Anzahl der SNPs prozentual in den jeweiligen Gruppen.

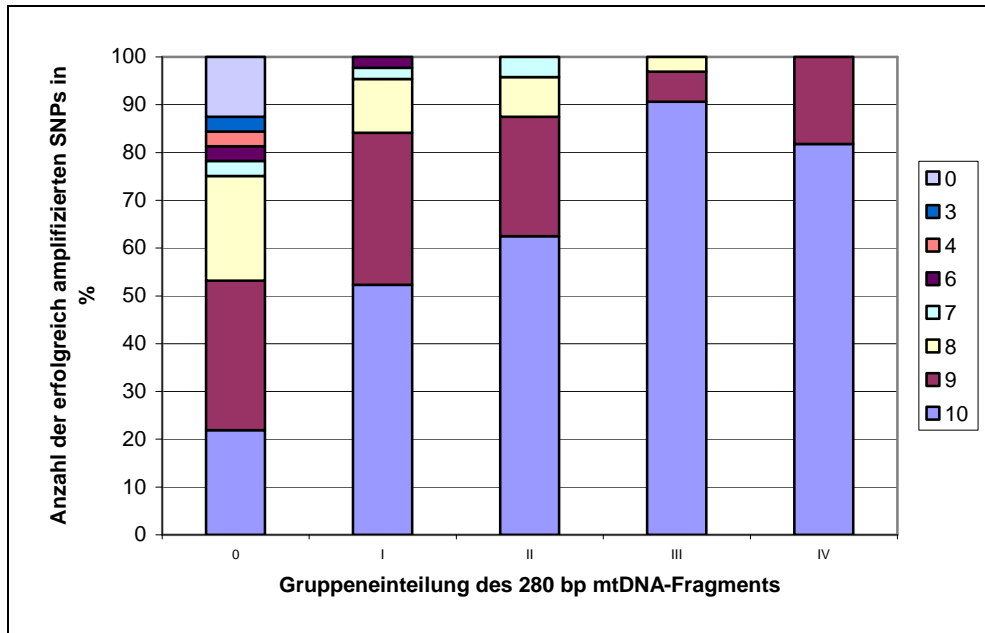


Abb. 24: Ergebnisse der SNP-Analyse im Vergleich mit den Ergebnissen der Screening-PCR.

Schematische Darstellung der erfolgreich amplifizierten SNPs in Abhängigkeit der Fluoreszenzeinheiten für das 280 bp mtDNA Fragment aus der Screening-PCR nach erfolgter Kapillarelektrophorese. Die Zahlen in der Legende geben die Anzahl der erfolgreich detektierten SNPs wieder.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass eine SNP-Analyse ab 50.000 rfu in der Screening-PCR, wie in den Gruppen III und IV, ohne Schwierigkeiten möglich war. Auch eine korrekte Zuordnung der Haplogruppe zu den SNP-Profilen mit neun und acht Signalen war durchführbar. Die nötige Anzahl der SNPs für eine Haplogruppeneinteilung ist abhängig von der entsprechenden Haplogruppe. So reicht der SNP 7028C allein aus, um die Haplogruppe H festzulegen. Für die Haplogruppe J dagegen sind fünf SNPs nötig. Auch in den Gruppen I und II konnte noch in über 80 % der Fälle ein fast vollständiges SNP-Profil erzielt werden. Die Zuordnung einer Haplogruppe bei den Proben aus Gruppe II gelang in sieben von neun Proben. Selbst wenn kein Signal in der Screening-PCR bei 280 bp sichtbar war, gelang bei über 50 % der Proben der Nachweis eines fast vollständigen SNP-Profiles. Acht von zehn SNPs konnten sogar in über 70 % der Proben nachgewiesen werden. Auch bei diesen Proben, ohne vollständiges SNP-Profil, gelang in zwölf von 21 Fällen die Zuordnung der Haplogruppe. Nur 12,5 % der Proben zeigten ebenfalls einen Komplettausfall der Signale in der SNP-PCR.

5.1.5.2 Vergleich der SNP-Analyse mit STR-Analysen an forensischen Proben

In der Routinearbeit werden bei der Bearbeitung von Spurenmaterial für die STR-Analyse kommerzielle Kits von zwei verschiedenen Firmen eingesetzt. Daher standen, für den Vergleich mit der SNP-Analyse, die STR-Ergebnisse aus dem AmpF ℓ STR $^{\text{®}}$ Identifiler $^{\text{TM}}$ Kit und aus dem PowerPlex $^{\text{®}}$ ES Kit zur Verfügung. Dabei wurden nicht alle Proben immer von beiden Kits analysiert. Teilweise wurde auch auf eine STR-Analyse vollständig verzichtet, wenn die Screening-PCR nur Signale für mitochondriale DNA anzeigte.

Insgesamt gelang der Vergleich von 116 Proben mit den Ergebnissen der AmpF ℓ STR $^{\text{®}}$ Identifiler $^{\text{TM}}$ Analyse und 104 Proben mit den Ergebnissen der PowerPlex $^{\text{®}}$ ES Analyse. Auch hier erfolgte eine Einteilung der STR-Ergebnisse vom Identifiler in Gruppen: Gruppe 0 (49 Proben) = keine Signale, Gruppe I (24 Proben) = 1–5 Signale, Gruppe II (16 Proben) = 6–10 Signale, Gruppe III (keine Proben) = 11–14 Signale, Gruppe IV (27 Proben) = 15 Signale. Da der Geschlechtsnachweis kein STR-System ist, wurde er hier nicht berücksichtigt. Allerdings konnte in fast allen Proben, bis auf fünf, der Gruppen I–IV das Geschlecht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 zusammengefasst.

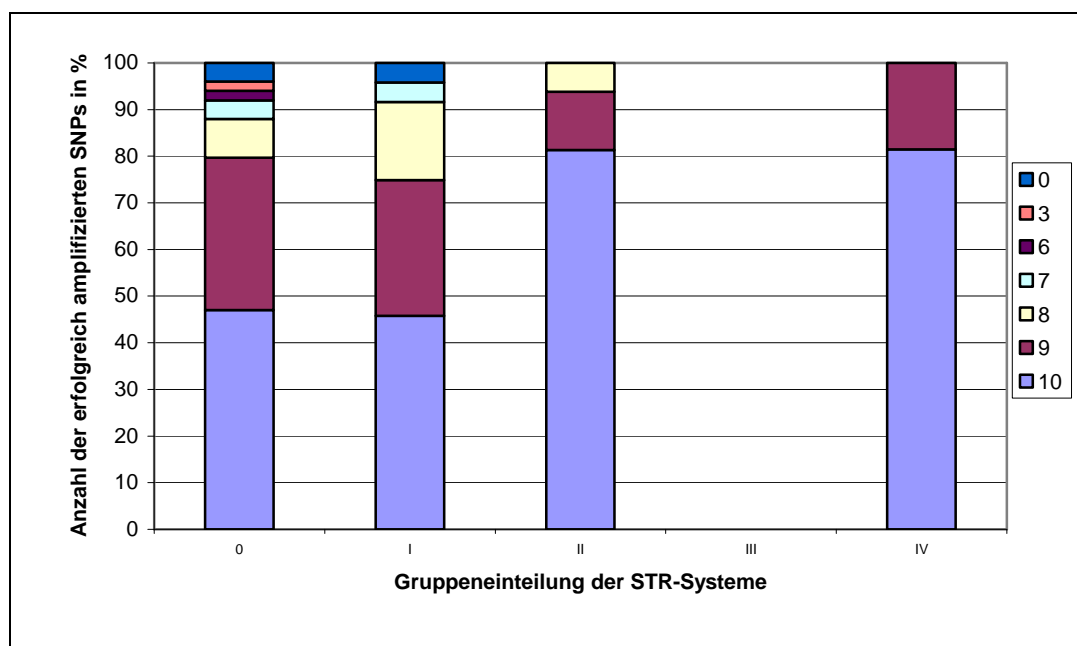


Abb. 25: Ergebnisse der SNP-Analyse im Vergleich mit den STR-Ergebnissen aus dem AmpF ℓ STR $^{\text{®}}$ Identifiler $^{\text{TM}}$.

Schematische Darstellung der erfolgreich amplifizierten SNPs in Abhängigkeit zur Anzahl der erfolgreich typisierten STRs aus dem AmpF ℓ STR $^{\text{®}}$ Identifiler $^{\text{TM}}$ nach der Kapillarelektrophorese. Die Zahlen in der Legende geben die Anzahl der erfolgreich amplifizierten SNPs wieder.

Ähnlich wie die Ergebnisse aus der Anaplex zeigten Proben aus Gruppe IV fast immer ein vollständiges SNP-Profil. Trotz des Ausfalls eines SNPs konnte die Haplogruppe in allen Proben sicher zugeordnet werden. In der Gruppe III gab es keine Proben. Gruppe II war in

den Ergebnissen ähnlich zu Gruppe IV. Auch hier konnte allen Proben die Haplogruppe zugefügt werden. Gruppe I amplifizierte in mehr als 70 % ein fast vollständiges Profil. Nur eine Probe war durch einen kompletten Ausfall der Signale gekennzeichnet, obwohl noch einzelne STRs nachweisbar waren. Eine Zuordnung der Haplogruppe gelang bei sieben von 13 Proben ohne vollständiges SNP-Profil. In Gruppe 0, die einen kompletten Ausfall aller STR-Systeme aufwies, konnte in fast 50 % der Proben noch der Nachweis aller zehn untersuchten SNPs realisiert werden. Bei Berücksichtigung der Proben mit dem Ausfall von ein bis zwei SNPs wurden fast 90 % der Proben noch erfolgreich analysiert. Die Zuordnung einer Haplogruppe gelang jedoch nur noch in sieben von 26 Proben. Für die restlichen Proben konnten hingegen Haplogruppen ausgeschlossen werden. Nur zwei Proben zeigten einen kompletten Signalausfall, sowohl bei den STRs als auch bei den SNPs.

Bei der Betrachtung der 104 Proben, die in der Powerplex analysiert wurden, entstand ein ähnliches Bild. Auch hier erfolgte die Einteilung der STR-Ergebnisse in Gruppen. Da mit dem PowerPlex[®]ES Kit nur acht STR-Systeme nachgewiesen wurden, ist die Zahl der Gruppen um eine reduziert: Gruppe 0 (41 Proben) = keine Signale, Gruppe I (24 Proben) = 1–4 Signale, Gruppe II (6 Proben) = 5–7 Signale und Gruppe III (33 Proben) = 8 Signale. Des Weiteren blieb der Geschlechtsnachweis unberücksichtigt, weil er bis auf sieben Proben immer erfolgreich typisiert werden konnte. Die Ergebnisse sind aus Abbildung 26 ersichtlich.

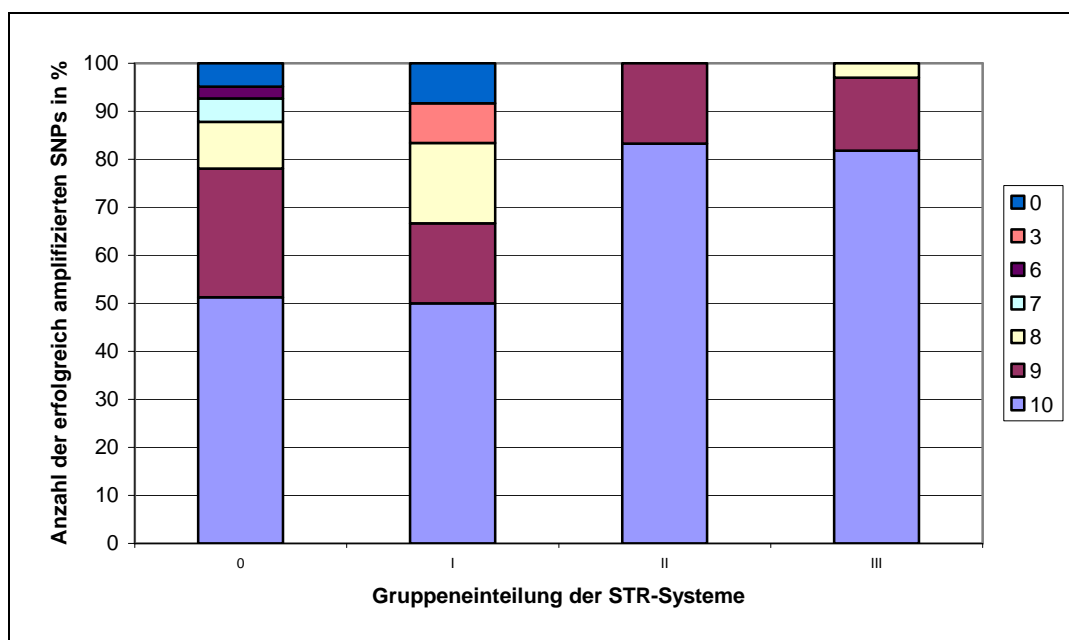


Abb. 26: Ergebnisse der SNP-Analyse im Vergleich mit den STR-Ergebnissen aus der PowerPlex ES.

Schematische Darstellung der erfolgreich amplifizierten SNPs in Abhängigkeit zur Anzahl der erfolgreich typisierten STRs aus der PowerPlex nach der Kapillarelektrophorese. Die Zahlen in der Legende geben die Anzahl der erfolgreich amplifizierten SNPs wider.

Auch hier gab es keine Schwierigkeiten SNPs nachzuweisen, wenn die STRs mehr als fünf Signale zeigten, wie in Gruppe II und III. Beide Gruppen wiesen in mehr als 80 % ein vollständiges SNP-Profil auf. Bei allen Proben mit nur neun oder acht analysierten SNPs gelang die sichere Zuordnung einer Haplogruppe. Bei weniger als vier STR-Systemen in Gruppe I war ein vollständiger SNP-Nachweis in 50 % der Fälle möglich. Über 80 % der Proben wiesen nur einen oder zwei SNP-Ausfälle auf. Die Zuordnung der Haplogruppe erfolgte nur in drei von zwölf Proben. Auch in Gruppe 0, mit einem kompletten Ausfall der STR-Systeme, konnten über 50 % der Proben ein vollständiges SNP-Profil aufweisen. Bei den Proben mit einigen SNP-Ausfällen gelang die erfolgreiche Zuordnung einer Haplogruppe nur in acht von 20 Proben. Lediglich zwei Proben zeigten, sowohl in den STRs als auch in den SNPs, einen Komplettausfall der Signale auf.

Die relative schlechte Quote bei der Zuordnung der Haplogruppen, besonders bei den Proben mit schlechten STR-Ergebnissen, beruht zum Teil auf Mischprofilen in der SNP-Analyse. Dies war erkennbar, wenn ein oder mehrere SNPs beide möglichen Signale detektierten. Da die Mischprofile nur in den Gruppen 0 und I, selten in Gruppe II, auftraten, konnte in den STR-Profilen kein Mischprofil nachgewiesen werden. Bei der Zuordnung der Mischprofile auf die unterschiedlichen untersuchten Objekte fiel auf, dass nur Spurenmaterial kontaminiert war. Bei Organen, Speichelproben und Blutkarten konnten keine Mischprofile analysiert werden. Die stark kontaminierten Knochen und Zahnproben stammten alle von einem Skelett, dass von Spaziergängern entdeckt wurde. Da auch bei späteren Ermittlungen nicht auf eine kontaminationsfreie Umgebung geachtet wurde, sind diese Mischspuren erklärbar. Bei dem Tempo-Taschentuch handelt es sich um einen 30 Jahre alten Fall. Da damals noch keine DNA-Analysen mittels PCR-Methoden durchgeführt, und daher auch keine Schutzmaßnahmen getroffen wurden, war das Mischprofil erklärbar. Allerdings fanden sich in allen Mischprofilen auch die authentischen Haplogruppen, die durch einen Vergleich mit den Organen oder Abstrichen bekannt waren. In der Abbildung 27 sind die Anteile von Proben mit Mischprofilen prozentual zu den Proben mit Haplogruppenzuordnung und ohne Zuordnung aufgezeigt.

Bei den Proben, die nicht mehr einer Haplogruppe zugeordnet werden konnten, war die DNA-Menge zu gering oder die Qualität derart schlecht, um alle SNPs analysieren zu können. Bei vielen Proben gelang nur noch der Ausschluss einiger Haplogruppen. Besonders anschaulich zeigte das ein DNA-Fall, bei dem ein Gehirn mehrere Jahre in Formalin lag. Der Versuch, aus diesen Proben erfolgreich SNPs zu amplifizieren, scheiterte.

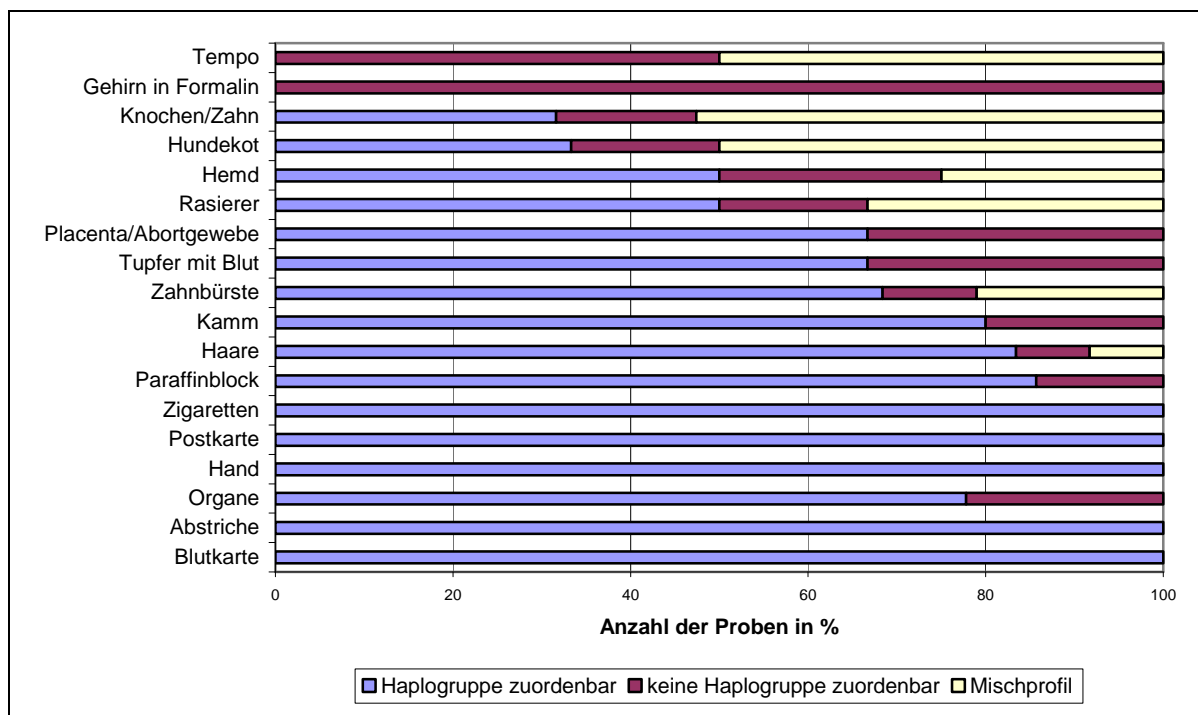


Abb. 27: Übersicht der Verteilung von Mischspuren, Proben mit zuordenbarer Haplogruppe und Proben ohne zuordenbare Haplogruppe.

Schematische Darstellung der Proben prozentual in Abhängigkeit zum Erfolg der Haplogruppenzuordnung.

5.1.6 Haplogruppenverteilung in den forensischen Proben

Anschließend wurde die Verteilung der einzelnen Haplogruppen in der untersuchten Stichprobe untersucht. Die Proben wurden zu den einzelnen Personen zusammengefasst. Zum Beispiel gingen das Vergleichsmaterial und die dazugehörigen Spuren als ein Wert in die Verteilung ein, begründet durch die Gesamtheit der Proben von einer Person. Wenn in einem DNA-Fall mehrere Personen involviert waren, wurden diese getrennt betrachtet. Die prozentuale Verteilung ist der Abbildung 28 zu entnehmen.

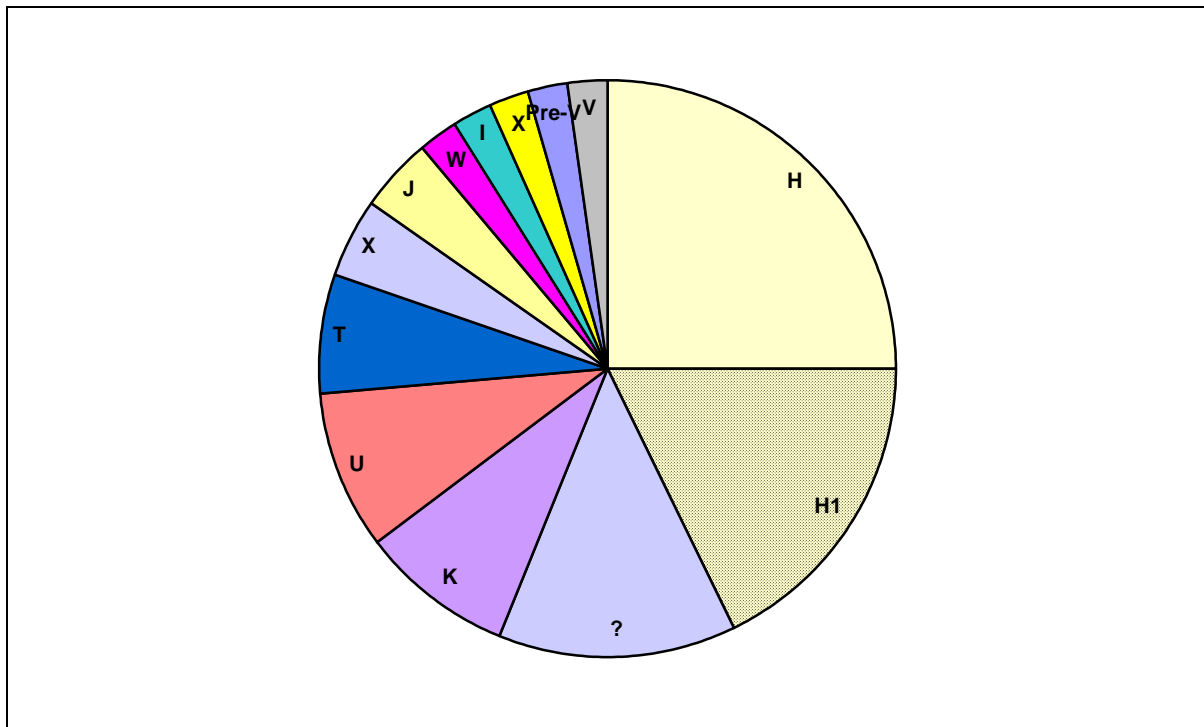


Abb. 28: Schematische Darstellung der prozentualen Verteilung der mitochondrialen Haplogruppen in der Stichprobe der forensischen Proben.

?: Proben, die keiner Haplogruppe zuzuordnen waren.

Insgesamt konnten 45 Personen in die Stichprobe einbezogen werden. Die meisten Personen gehören der Haplogruppe H (42,2 %) an. Davon sind 42 % der Haplogruppe H1 zuzurechnen. Im Ganzen nahm die Haplogruppe H1 17,7 % der Stichprobe ein. Mit einigem Abstand folgten die Haplogruppen K und U (8,8 %). Sechs Proben konnten keiner Haplogruppe zugeordnet werden. Anhand des Schemas (Abb. 11) gehörten vier Proben zur Haplogruppe W, aber sie wiesen den SNP 8251T nicht auf, sodass eine Zuordnung nicht möglich war. In einer weiteren Probe fiel das Signal für SNP 12372 aus und in der sechsten Probe (Gehirn in Formalin) führte der Nachweis der SNPs nicht zum Erfolg.

5.2 Auswertung der Dekontaminationsversuche

5.2.1 Überprüfung des Dekontaminationserfolges mittels Duplex-PCR

Zunächst erfolgte die Auswertung der Dekontamination mittels UV-Licht-Bestrahlung.

Alle Proben wurden erst in die Duplex-Inhibitor-PCR eingesetzt, da die Screening-PCR zum Zeitpunkt der Analyse noch nicht im Labor etabliert war. Inhibitorische Substanzen ließen sich in keiner Probe feststellen. Im Anschluss folgte eine Duplex-PCR. Zur Auswertung wurden die Proben gezählt, die entweder ein oder beide Signale aufwiesen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 graphisch dargestellt.

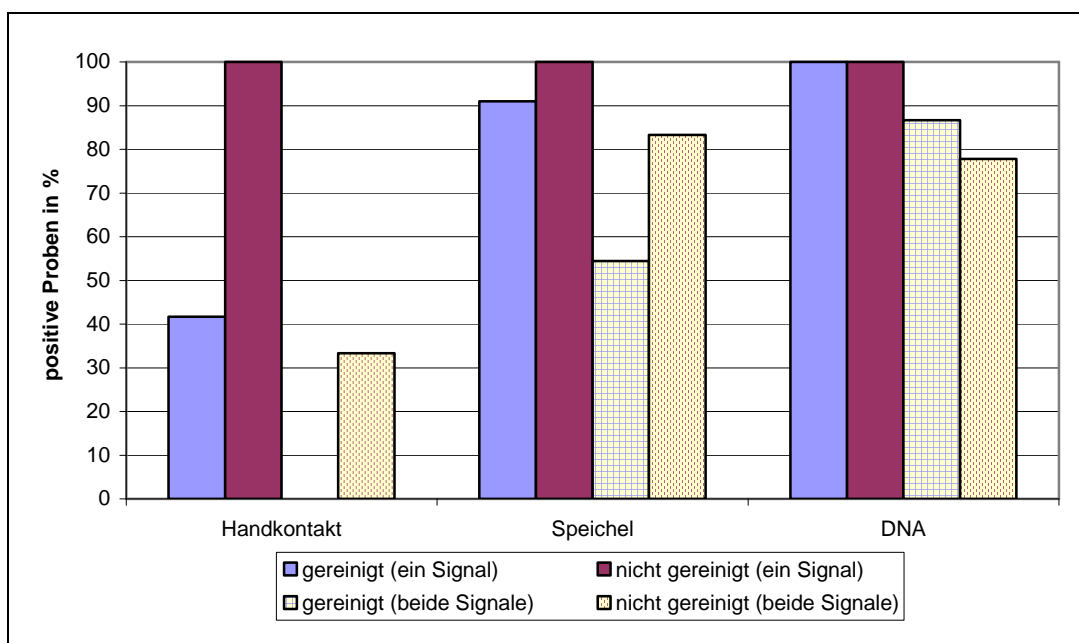


Abb. 29: Amplifikationserfolg der nukleären und mitochondrialen DNA der unterschiedlich kontaminierten Knochenproben. Schematische Darstellung der Anzahl der Proben in Prozent, die positive Signale in der Duplex-PCR aufwiesen. Dabei erfolgte eine Unterscheidung zwischen den Proben, die mindestens ein Signal amplifizierten (nukleäre oder mtDNA) und Proben, die beide Signale (nDNA und mtDNA) detektierten.

Bei den gereinigten Proben aus Gruppe I (Handkontakt) amplifizierten fast 42 % der Proben ein mitochondriales Signal. Jedoch waren die Signale relativ klein. Von den fünf mtDNA-Signalen waren drei unter 5.000 rfu und die anderen zwei unter 27.000 rfu. Bei allen anderen gereinigten Proben mit Handkontakt ließ sich keine DNA amplifizieren. Die Knochen ohne Reinigung dagegen wiesen in 100 % der Proben mindestens ein Signal auf. Auch bei diesen Proben wurde meistens das mitochondriale Fragment amplifiziert. In zwei Proben zeigte sich nur das nukleäre Fragment. Beide Signale traten bei etwa 33 % der Proben auf. Insgesamt waren die Signale deutlich höher als bei den gereinigten Proben. Trotzdem konnte nicht bei allen Knochen eine gleichmäßige Kontamination festgestellt werden.

In der Gruppe II (Speichel) wurde nach der Reinigung in 91 % der Fälle noch eines der beiden Signale nachgewiesen. Lediglich in einer Probe gelang keine Amplifikation von DNA. Bei 54,5 % der Proben waren beide Signale nach der Reinigung erkennbar und auch die Signalstärken beliefen sich bei fast allen Proben auf über 20.000 rfu. Bei den nicht gereinigten Proben amplifizierte nur eine Probe ausschließlich mtDNA. Die restlichen fünf Proben waren durch das Vorhandensein beider Signale gekennzeichnet. Somit konnte mit Speichel ein Knochen sehr gut kontaminiert werden und die durchgeführte Reinigung brachte wenig Erfolg.

Bei der dritten Gruppe (DNA) zeigten die gereinigten Knochenproben in allen Fällen ein Signal für mtDNA. Auch nDNA konnte in fast allen Proben, bis auf zwei, nachgewiesen werden. Ebenso sind die Ergebnisse der nicht gereinigten Proben zu werten. Auch hier amplifizierten zwei Proben nur ein Signal. Jedoch fehlte einer Probe ein Signal für nDNA und der anderen eins für mtDNA. Somit konnte insgesamt die Kontamination mittels DNA-Lösung mit der angewendeten Reinigungsprozedur nicht erfolgreich entfernt werden.

5.2.2 Überprüfung des Dekontaminationserfolges mittels STR-Analyse

Es wurden alle Proben für eine STR-Analyse in den AmpF ℓ STR[®] Identifier[™] eingesetzt. Bei der Auswertung wurden nur Proben mit mehr als drei amplifizierten STR-Systemen gezählt und prozentual berechnet. Die Ergebnisse sind der Abbildung 30 zu entnehmen.

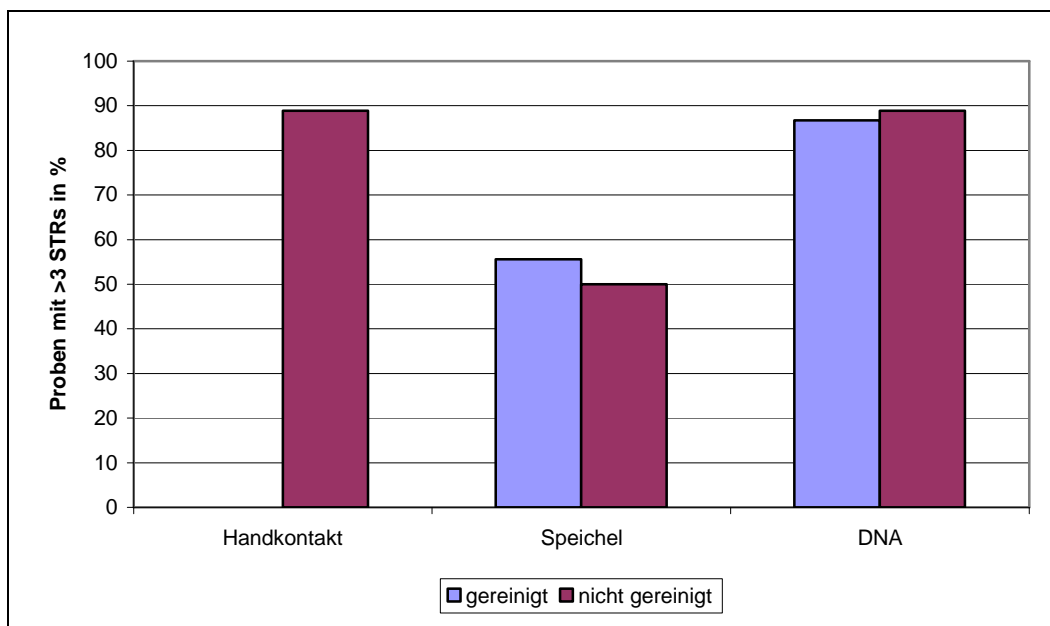


Abb. 30: Amplifikationserfolg der STR-Systeme bei den unterschiedlich kontaminierten Knochen.
Schematische Darstellung der prozentualen Anzahl der Proben mit mehr als drei reproduzierbaren STR-Systemen nach der Kapillarelektrophorese.

In Gruppe I (Handkontakt) konnte bei den gereinigten Proben kein STR-Profil mit mehr als drei Systemen amplifiziert werden. Vereinzelt traten Signale auf, die aber nicht reproduzierbar waren. Außerdem konnte festgestellt werden, dass einige Signale nicht mit denen der kontaminierenden Personen übereinstimmten. Auch diese fremden Signale waren nicht reproduzierbar. Somit entsprachen diese Ergebnisse denen der Duplex-PCR, da auch dort sich die Amplifikation von nukleärer DNA als erfolgreich darstellte. Bei den nicht gereinigten Knochenproben zeigten nur zwei Proben weniger als drei Signale. Alle anderen wiesen die Profile der kontaminierenden Personen auf, wobei oft nur ein Allel pro Person detektiert werden konnte, auch wenn das Allel ursprünglich heterozygot war. Zusätzlich fanden sich wieder einige Signale, die nicht den Personen oder dem Bearbeiter zuzuordnen und auch nicht reproduzierbar waren.

In der Gruppe II (Speichel) konnten bei vier der gereinigten Proben nicht mehr als drei STR-Systeme nachgewiesen werden. Bei den anderen Proben wurden einige Systeme falsch homozygot amplifiziert. Die nicht gereinigten Proben zeigten von den vier eingesetzten Proben in den Identifiler nur zwei mehr als drei Signale. Diese schlechten Ergebnisse sind gegebenenfalls auf die geringe Gruppengröße zurückzuführen.

In der Gruppe III (DNA) gelang in fast 90 %, sowohl der gereinigten als auch der nicht gereinigten Proben, die Amplifikation von mehr als drei von den untersuchten 16 STR-Systemen. Diese Ergebnisse stimmten auch gut mit den Ergebnissen der Duplex-PCR überein. Wenn in der Duplex-PCR keine oder nur wenig nDNA amplifiziert werden konnte, war auch die Anzahl der erfolgreich typisierten STR-Systeme gering.

5.2.3 Überprüfung der Dekontamination nach Reinigung mit Bleiche

Da im Laufe der Arbeit die Dekontaminationsmethode für die Knochenproben umgestellt wurde, erfolgte zunächst eine Testung dieser Methode im Hinblick auf den Dekontaminationserfolg.

Alle sechs Gehörknöchelchen wurden in die Screening-PCR eingesetzt. Die Auswertung der untersuchten Systeme ergab in keinem Fall ein Mischprofil. Alle amplifizierten Signale sind identisch mit den Signalen, die aus den Blutkarten amplifiziert wurden. Es zeigte sich somit kein Unterschied zwischen den drei Proben mit getrocknetem bzw. frischem Blut. Die genauen Ergebnisse sind der Tabelle 25 zu entnehmen. Zusätzlich zu den Ergebnissen sind in der Tabelle ebenfalls die Ergebnisse der Blutkarten aus der Powerplex ES sowie das Profil des kontaminierenden Blutes aufgelistet. Weiterhin werden die Ergebnisse einer Y-STR-Analyse aus dem kontaminierenden Blut mit angegeben.

Trotz der Übereinstimmung einiger, einzelner Allele zwischen dem Profil der Frauen und dem des Mannes kann eine Kontamination ausgeschlossen werden, weil in den STRs einzig die Allele der Frauen amplifiziert wurden und weder bei den Y-STRs noch im Amelogeninsystem ein männliches Signal detektiert wurde. Somit reichte eine chemische Dekontamination aus, um die kontaminierende DNA zu entfernen, ohne die authentische DNA zu zerstören. Die schlechten Ergebnisse bei Probe GK 3re* sind möglicherweise darauf zurückzuführen, dass dieser Amboss bei der Präparation aus der Leiche beschädigt wurde und nicht mehr vollständig vorlag.

Tab. 25: Vergleich der Ergebnisse aus dem Dekontaminationsversuch, den Blutkarten und dem Blut des männlichen Mitarbeiters.

BK: Blutkarte, GK: Gehörknöchelchen, li: links (Blut war nicht getrocknet), re: rechts (Blut war getrocknet), n.d.: nicht durchgeführt, *: dieser Amboss war nicht vollständig erhalten.

Probe	Amelogenin	vWA	TH01	DYS390	DYS391	mt280	mt439
BK 1	X	17/18	6/8	-	-	n.d.	n.d.
GK 1li	X	17/18	6/8	-	-	6830	-
GK 1re	X	17/18	6/8	-	-	1406	-
BK 2	X	15	7/9,3	-	-	n.d.	n.d.
GK 2li	X	15	7/9,3	-	-	15955	-
GK 2re	X	15	7/9,3	-	-	12636	-
BK 3	X	14/16	9	-	-	n.d.	n.d.
GK 3li	X	14/16	9	-	-	10495	-
GK 3re*	X	-	-	-	-	-	-
Blut ♂	XY	16/17	6/9,3	25	10	n.d.	n.d.

5.3 Molekulargenetische Analysen an Leichenbrand

5.3.1 Modifikation der Extraktionsmethode

Am Anfang erfolgte an acht Proben je Gräberfeld von der ersten Entnahme (Süderbrarup, Gremersdorf und Sörup II) die Austestung, ob eine Zugabe von Proteinase K in den Lysis-Schritt eine Auswirkung auf die Ergebnisse hat. Dafür wurden je 0,5 g Knochenpulver pro Probe, einmal mit und einmal ohne Proteinase K, extrahiert. Anschließend wurden die Proben mit einem der beschriebenen Kits aufgereinigt und mittels Duplex-PCR und Inhibitor-PCR getestet. Es stellte sich heraus, dass die Proben mit Proteinase K nach der Aufreinigung weniger stark inhibiert wurden. Die einzelnen Werte sind der Tabelle 26 zu entnehmen. Aufgrund dieser Ergebnisse erfolgte die Extraktion aller weiteren Knochen mit Proteinase K im Lysis-Schritt.

Tab. 26: Ergebnisse der Proteinase K Austestung in der Extraktion.

	Sörup II	Süderbrarup	Gremersdorf
Proben ohne Proteinase K	8	8	8
davon hemmen	8 (100 %)	7 (87,5 %)	6 (75 %)
Proben mit Proteinase K	8	8	8
davon hemmen	5 (62,5 %)	5 (62,5 %)	2 (25 %)

5.3.2 Urnengräberfeld Gremersdorf

5.3.2.1 DNA-Ausbeute und Inhibition

Aus dem Gräberfeld Gremersdorf wurden insgesamt, nach zweimaliger Beprobung, sieben Urnen mit 108 Proben bearbeitet.

Mit der ersten Extraktionsmethode (Forensic Kit mit zusätzlicher Proteinase K) wurden 77 Knochenproben analysiert. Dabei wurden 26 Proben (33,7 %) in der PCR-Analyse, trotz einer Aufreinigung mit einem der oben genannten Kits, gehemmt. Aus fünf Proben konnten Signale für mtDNA in der Duplex-PCR amplifiziert werden. Nach einer erneuten Extraktion (3 Tage EDTA und Spin Forensic Kit) waren die Signale in vier von fünf Proben reproduzierbar.

Mit der zweiten, veränderten Extraktionsmethode (ein Tag EDTA-Behandlung und Spin Forensic Kit) erfolgte die Isolierung der restlichen 31 Proben. Lediglich sechs Proben (19,4 %) wurden in der PCR-Analyse ohne zusätzliche Aufreinigung gehemmt. Dabei entstammten fünf der sechs Proben aus einer Urne. In acht Proben konnte hier der Nachweis von mtDNA in der Duplex-PCR erbracht werden. Eine erneute Extraktion gelang nur an drei Proben, da von den restlichen fünf Proben kein Knochenpulver mehr vorrätig war. In zwei Proben funktionierte es erneut, mtDNA zu amplifizieren.

5.3.2.2 Nachweis der Haplogruppe

Aufgrund der Ergebnisse der Duplex-PCR wurden sowohl die Proben, die im ersten Durchgang Signale zeigten, als auch die Proben, die reproduziert werden konnten, in die SNP-Analyse der Haplogruppen eingesetzt. Die einzelnen Profile sind in der Tabelle 27 dargestellt.

Tab. 27: Ergebnisse der SNP-PCR zum Haplogruppennachweis bei den Leichenbrandproben.

Angegeben ist jeweils das beste Profil pro Probe. Die Proben, bei denen in 8697 kein C steht, amplifizierten Thymin. Da dieses aber mit dem Artefakt deckungsgleich ist, kann nicht unterschieden werden, ob das Fragment (um den SNP herum) degradiert ist und deshalb kein Cytosin nachgewiesen werden kann, oder ob das Signal für Thymin echt ist. n: neu isolierte Proben.

	Urne	lfd. Nr.	7028	3010	1719	8251	8697	12372	13708	14766	14798	15904
	Bearbeiter		T	G	G	C	C	G	G	C	T	G
Urnengräberfeld Gremersdorf	202	43/6n	-	-	-	C	C	-	G	-	-	-
	203	44/2n	T	-	G	C	C	-	G	T	T	G
	208	45/1	T	-	G	C	C	A	G	T	C	G
		45/6	T	-	G	C	C	A	G	T	C	-
		45/6n	-	-	G	C/T	C	-	G	C/T	C/T	G
	406	66/4	C	-	G	C	C	-	G	-	-	-
		66/10	T	-	G	C	C	-	G	T	T	G
	410	67/1	T	G	G	C	C	-	G	C	T	-
	411	68/7	T	-	G	C	C	-	G	T	T	G
		68/8	T	-	G	C	C	-	G	-	-	G

Von den insgesamt 13 Proben mit einem positiven Signal in der Duplex-PCR konnten zehn Proben erfolgreich in der SNP-PCR amplifiziert werden. Die zwei Proben aus der Urne 208 lassen sich der Haplogruppe K zuordnen. Allerdings konnte in der neuisolierten Probe nur ein Mischprofil amplifiziert werden. Aus der Probe 67/1 konnten die SNPs 7028T und 14766C nachgewiesen werden. Dies könnte auf die Überhaplogruppe Pre-V hindeuten. Bei den anderen Proben gelang die Zuordnung nicht. Zwar könnte die Probe 66/4 (Urne 406) der Haplogruppe H zugeordnet werden, jedoch eine Wiederholung der Probe brachte an dieser Position (7028) keine Bestätigung. Zusätzlich wies die Probe 66/10 aus der gleichen Urne an der Position 7028 ein Thymin auf, welches auch reproduziert werden konnte. Somit ist die Haplogruppe H für diese Proben eher unwahrscheinlich. Aus der Urne 411 waren die SNP-Profile aus den Proben identisch. Leider gelang der Nachweis der Position 12372 kaum in den Proben, der für die Einteilung einiger Haplogruppen entscheidend ist.

5.3.2.3 Verbrennungsgrad der Proben

Da sich der Verbrennungsgrad in der Knochenfarbe widerspiegelt, wurden die Knochen diesbezüglich ausgewertet. Den größten Anteil erbrachten die weiß-grau verfärbten Knochen (32,4 %), gefolgt von weiß (23,1 %), schwarz (15,6 %), grau (12,1 %), weiß-schwarz (11,1 %) und weiß-grau-schwarz (5,7 %) verfärbten Knochen. Somit wies dieses Gräberfeld einen relativ schlechten Verbrennungsgrad auf, da der Anteil an Knochen mit grauen oder schwarzen Bestandteilen sich verhältnismäßig hoch darstellte.

Die 13 Proben, welche im ersten Durchgang DNA in der Duplex-PCR enthielten, hatten folgende Verfärbungen: je vier Proben waren schwarz oder weiß-grau, je zwei waren weiß-schwarz oder weiß und ein Knochen war weiß-grau-schwarz. Schlussfolgernd waren die meisten DNA-haltigen Proben unter den unvollständig verbrannten Knochen zu finden.

Eine Besonderheit bei der Extraktion beider Methoden wies die Farbe des Überstandes auf, welche durch den Lysis-Schritt entstand. Bei 76,8 % der Proben war dieser gelb, bei 14,8 % braun und bei 7,4 % rotbraun, in einer Probe sogar rot. Die sechs Proben, die nach der zweiten veränderten Extraktionsmethode gehemmt wurden, zeigten alle einen rotbraunen oder braunen Überstand. Allerdings gab es auch Proben mit einem rotbraunen oder braunen Überstand, die nicht inhibiert wurden.

5.3.3 Urnengräberfeld Süderbrarup

5.3.3.1 DNA-Ausbeute und Inhibition

Das Gräberfeld Süderbrarup erfuhr ebenfalls eine zweimalige Beprobung. Insgesamt erfolgte hier die Analyse von neun Urnen mit 127 Proben. 90 Proben wurden mit der ersten Extraktionsmethode analysiert. Dabei konnte eine relativ hohe Belastung mit Hemmstoffen festgestellt werden. So wurden 42 Proben (46,7 %) trotz erfolgter Aufreinigung inhibiert.

DNA konnte in zehn Proben mittels Duplex-PCR analysiert werden. Von diesen zehn Proben enthielten fünf nur Signale für mtDNA, von denen drei reproduzierbar waren. Zwei Proben zeigten nur Signale für nDNA, wovon eine Probe nach einer erneuten Extraktion mtDNA aufwies. Die nDNA war nicht reproduzierbar. In drei von den zehn Proben konnten beide Signale detektiert werden. Nach einer erneuten Extraktion gelang lediglich der Nachweis von mtDNA in einer Probe. Die zehn Proben entstammten aus vier verschiedenen Urnen.

Von den 37 Proben, die mit der zweiten Extraktionsmethode analysiert wurden, konnte keine Inhibition festgestellt werden. Allerdings zeigten auch die Proben aus denselben Urnen, die mit der ersten Extraktionsmethode analysiert wurden, kaum Belastungen mit Hemmstoffen. Auch aus diesen Proben gelang in acht Knochen der Nachweis von mtDNA. Leider funktionierte die Reproduktion nur in einer Probe nach einer erneuten Extraktion. Allerdings konnten vier der acht Proben nicht nochmals extrahiert werden, da kein Material mehr vorhanden war.

5.3.3.2 Nachweis der Haplogruppe

Aufgrund der Ergebnisse der Duplex-PCR wurden sowohl die Proben, die im ersten Durchgang Signale zeigten, als auch die Proben, die reproduziert werden konnten, in die SNP-Analyse der Haplogruppen eingesetzt. Die einzelnen Profile sind der Tabelle 28 zu entnehmen.

Tab. 28: Ergebnisse der SNP-PCR zum Haplogruppennachweis bei den Leichenbrandproben.

Angegeben ist jeweils das beste Profil pro Probe. Die Proben, bei denen in 8697 kein C steht, amplifizierten Thymin. Da dieses aber mit dem Artefakt deckungsgleich ist, kann nicht unterschieden werden, ob das Fragment (um den SNP herum) degradiert ist und deshalb kein Cytosin nachgewiesen werden kann, oder ob das Signal für Thymin echt ist.

n: neu isolierte Proben, n2: nochmals neu isolierte Probe, kleine Buchstaben: Signale waren sehr klein.

	Urne	lfd. Nr.	7028	3010	1719	8251	8697	12372	13708	14766	14798	15904
	Bearbeiter		T	G	G	C	C	G	G	C	T	G
Urnengräberfeld Süderbrarup	671	52/1	-	-	G	-	C	-	G	-	-	-
		52/1n	-	-	G	C	C	-	-	-	-	G
	725	53/3n	T	-	G	C	C	A	G	-	-	G
	729	54/2n	T	-	G	C	C	A	G	-	-	G
		54/4n	T	-	G	C	C	A	G	-	-	G
		54/4n2	-	-	G	C	C	A	G	-	-	G
		75/2	-	-	G	C	-	-	G	-	-	G
		75/2n	T	-	G	C	C	-	G	T	T	G
		75/4	-	-	G	C	-	-	G	C	T	G
		75/7	T	-	G	C	-	-	G	T	T	G
	809	56/2	-	-	G	C	C	-	G	-	-	--
		56/7	-	-	G	C	C	-	G	-	-	G
		77/7	t	G	G	C	-	-	G	-	-	G
		77/9	T	G	G	C	C	A	G	T	T	G
	156a	69/2	T	G	G	C	-	g	G	T	T	g
		69/2	T	-	G	C	-	a	G	T	T	G
		69/3	-	G	-	-	-	-	G	-	-	-
	291	70/10	-	A	-	-	-	-	G	-	T	-
		70/10	C	-	G	C	C	G	G	C	T	G

Insgesamt erbrachten 17 Proben ein Teilprofil in der SNP-Analyse. Die Proben der Urne 671 konnten keiner Haplogruppe zugeordnet werden, da zu viele Positionen keine Signale detektierten.

Die Haplogruppe der Probe aus Urne 725 konnte nur auf Pre-V, K oder U eingegrenzt werden, weil die Signale für Position 14766 und 14798 fehlten.

Von der Urne 729 gelang der Nachweis eines Teilprofils aus sieben Proben. Dabei stammten die Proben mit der Nummer 54 aus der ersten Beprobung und die Proben mit der Nummer 75 aus der zweiten. Sofern ein Vergleich durchgeführt werden konnte, zeigten sechs der Proben identische Profile. Nur die Probe 75/4 detektierte trotz mehrfacher Wiederholungen an der Position 14766 widersprüchliche Ergebnisse. Da das größte amplifizierte Signal ein C war, ging dieses in die Bewertung ein. Bei anderen Amplifikaten war ein sehr kleines Signal für T sichtbar. Damit unterschied sich die Probe von den anderen Proben an dieser Position. Eine Zuordnung zur Haplogruppe U wäre bei Annahme von Thymin an Position 14766 möglich.

Von der Urne 809 konnten vier Proben erfolgreich amplifiziert werden. Dabei stammten auch hier die Proben 56/2 und 56/7 aus der ersten Beprobung und die Proben 77/7 und 77/9 aus der zweiten. Alle vier Proben zeigten, sofern amplifiziert, die gleichen Signale. Die Probe 77/9 wurde insgesamt sieben mal in die PCR eingesetzt und alle Elektropherogramme waren

identisch. Es konnten bis zu neun Signale aus einem Durchgang amplifiziert werden. In der Tabelle 28 sind die Proben zusammengefasst und sie ergeben ein vollständiges Profil, so dass die Proben der Urne 809 ebenfalls der Haplogruppe U zugeordnet werden konnten.

Aus der Urne 156a wurden zwei Proben in die SNP-Analyse eingesetzt. Hier lieferte die Probe 69/2 zwei verschiedene Signale an der Position 12372. Beim ersten Durchgang allerdings war auch das Signal für 15904 sehr klein, sodass eine eindeutige Auswertung schwer möglich war. Im zweiten Durchgang wies die Probe ein eindeutiges Signal für 15904G und ein kleines Signal für 12372A auf. Durch dieses widersprüchliche Ergebnis war eine Zuordnung der Haplogruppe nicht eindeutig gegeben.

Aus der Urne 291 konnte nur eine Probe getestet werden. Diese wurde zweimal amplifiziert und zeigte u.a. SNPs an Position 7028T, 3010A und 14766C. Somit war diese Probe der Haplogruppe H1 zuzuteilen.

5.3.3.3 Verbrennungsgrad der Proben

Die Auswertung der Knochenfarbe erbrachte 46,5 % grau-weiß, 36,2 % weiß, 7,9 % grau, 3,9 % weiß-schwarz, 3,1 % weiß-grau-schwarz und 2,4 % schwarz kolorierte Knochen. Daraus resultierend gehörten diese Proben zu den sehr gut verbrannten Leichenbränden.

Erfolgte die Einteilung der 18 Proben, die in der ersten Duplex-PCR Signale zeigten, nach ihrem Verbrennungsgrad, entsteht folgendes Bild: 50 % waren weiß-grau verfärbt, 33,3 % waren weiß und 16,7 % waren weiß-schwarz.

Der Überstand der Proben bei der Extraktion erschien überwiegend gelb (81,9 %). Unter 7 % lagen die Farben braun, rotbraun, rot und grün. Die meisten Proben mit braunen Überständen wurden später in den PCRs gehemmt. Die Proben mit roten Überständen hatten auch auf den Knochen sichtbare rötliche Antragungen. Bei den Proben mit grünlichem Überständen waren keine Auffälligkeiten sichtbar.

5.3.4 Urnengräberfeld Sörup II

5.3.4.1 DNA-Ausbeute und Inhibition

Bei der Beprobung des Gräberfeldes Sörup II, ebenfalls zweimal ausgeführt, wurden fünf Urnen mit 71 Proben getestet. Mit der ersten Extraktionsmethode fand die Analyse an 50 Proben statt. Dabei trat eine Hemmung in 18 Proben (36 %) trotz Aufreinigung auf. Unter den 50 Proben fanden sich zwei Proben, bei denen nukleäre DNA in der Duplex-PCR nachgewiesen werden konnte. Nach einer erneuten Extraktion konnte in einer der beiden Proben ein Signal für mtDNA amplifiziert werden, welches in einer erneuten Duplex-PCR auch bestätigt wurde. In der zweiten Probe gelang die Bestätigung des DNA-Signals nicht.

Mit der zweiten Extraktionsmethode wurden 21 Proben extrahiert. Bei sechs Proben (28,6 %) konnten Hemmstoffe nachgewiesen werden. Der Nachweis von mtDNA funktionierte in einer Probe. Eine erneute Extraktion dieser Probe erfolgte nicht, da kein Knochenpulver mehr vorhanden war.

5.3.4.2 Nachweis der Haplogruppe

In die SNP-Analyse wurde die Probe aus der ersten Entnahme mit mtDNA und die Probe aus dem zweiten Durchgang eingesetzt. Die Werte sind der Tabelle 29 zu entnehmen.

Tab. 29: Ergebnisse der SNP-PCR zum Haplogruppennachweis bei den Leichenbrandproben.

Die Proben, bei denen in 8697 kein C steht, amplifizierten Thymin. Da dieses aber mit dem Artefakt deckungsgleich ist, kann nicht unterschieden werden, ob das Fragment (um den SNP herum) degradiert ist und deshalb kein Cytosin nachgewiesen werden kann, oder ob das Signal für Thymin echt ist. n: neu isolierte Proben.

	Urne	lfd. Nr.	7028	3010	1719	8251	8697	12372	13708	14766	14798	15904
	Bearbeiter		T	G	G	C	C	G	G	C	T	G
Urnengräberfeld Sörup II	81	58/1n	T	-	G	C/T	C	A	G	T	T	G
	160	80/4	C	G	G	C	C	-	G	C	T	--
		80/4	C	-	G	C	C	-	G	C	T	G
		80/4	-	-	G	C	C	-	G	-	T	-
		80/4	C	-	G	C	-	-	G	C	T	G
		80/4	-	-	G	C	-	-	G	-	-	G

Die SNP-Analyse zur Bestimmung der Haplogruppe erfolgte an der Probe aus Urne 160 mehrmals. Es konnten fünfmal unabhängig voneinander mehrere Signale amplifiziert werden, die die Probe in die H-Haplogruppe einordneten. Zusätzlich traten bei dieser Probe keine Unstimmigkeiten auf.

Bei der Probe aus Urne 81 trat an Position 8251 ein widersprüchliches Ergebnis auf. Es wurden beide Signal gut erkennbar amplifiziert. Einzuordnen wäre diese Probe in die Haplogruppe U.

5.3.4.3 Verbrennungsgrad der Proben

Bei der Auswertung der Knochenfarbe konnten 30 Proben als weiß und 33 Proben als weiß-grau bestimmt werden. Vier Knochenfragmente waren grau, einer grau-schwarz und drei weiß mit schwarzen Resten. Folglich ergab sich, dass fast 89 % der Proben sehr stark verbrannt waren. Die drei Proben, bei denen DNA detektiert werden konnte, stellten sich farblich als weiß-grau dar.

Der Überstand der Proben bei der Extraktion war überwiegend gelb (71,8 %). Ferner existierten braune (11,3 %), orange (5,6 %) und grün-türkise (11,3 %) Überstände. Beim Vergleich der Überstandsfarben mit einer anschließenden Hemmung fiel auf, dass besonders Proben, die keinen gelben Überstand hatten, häufiger gehemmt wurden. Von den 20 nicht gelben Überständen wurden später acht DNA-Proben (40 %) inhibiert. Von den 51 Proben mit gelben Überstand konnte in 31,4 % der Proben eine Hemmung festgestellt werden. Eine Voraussage einer Inhibition war daher, rein anhand der Überstandsfarbe, nicht möglich.

5.3.5 Urnengräberfeld Norderbrarup

5.3.5.1 DNA-Ausbeute und Inhibition

Von den fünf Urnen aus Norderbrarup mit 47 Proben wurden zunächst 40 Proben aus vier Urnen mit dem Forensic Kit und zusätzlicher Proteinase K isoliert und anschließend mit einem der oben genannten Kits aufgereinigt. Aus diesen Proben gelang kein Nachweis von DNA in der nachfolgenden Duplex-PCR. Auch mit der Screening-PCR waren keine Signale erkennbar. Der Inhibitor-Test detektierte in 15 Proben (37,5 %) eine Hemmung in der PCR-Reaktion.

Die sieben restlichen Proben aus Urne 30 wurden mit EDTA dekalzifiziert und mit dem Spin Forensic Kit isoliert. Bei diesen Proben konnte keine Inhibition festgestellt werden. Ferner amplifizierte die Duplex-PCR in drei Proben DNA. In zwei der drei Proben gelang die Detektion eines mitochondrialen Signals. Die dritte Probe wies ein nukleäres Signal auf. Alle drei Proben wurden nochmals extrahiert, um die Ergebnisse zu reproduzieren. Dabei zeigte nur die Probe, die zunächst ein nukleäres Signal detektierte, ein mitochondriales Signal, welches in einer erneuten Duplex-PCR nicht mehr reproduzierbar war.

5.3.5.2 Nachweis der Haplogruppe

Anschließend wurde eine SNP-Analyse zur Bestimmung der Haplogruppen durchgeführt. Die einzelnen Profile sind der Tabelle 30 zu entnehmen.

Tab. 30: Ergebnisse der SNP-PCR zum Haplogruppennachweis bei den Leichenbrandproben.

Die Proben, bei denen in 8697 kein C steht, amplifizierten Thymin. Da dieses aber mit dem Artefakt deckungsgleich ist, kann nicht unterschieden werden, ob das Fragment (um den SNP herum) degradiert war und deshalb kein Cytosin nachgewiesen werden konnte, oder ob das Signal für Thymin echt ist. n: neu isolierte Proben.

	Urne	Lfd. Nr.	7028	3010	1719	8251	8697	12372	13708	14766	14798	15904
	Bearbeiter		T	G	G	C	C	G	G	C	T	G
Urnengräberfeld Norderbrarup	30	84/1	-	G	-	-	-	-	G	-	-	-
		84/1	-	-	G	-	-	-	G	-	-	-
		84/1	-	-	G	-	-	-	G	-	-	-
		84/1n	-	-	G	-	C	-	G	-	-	G
		84/1n	C	-	G	C	-	-	G	C	T	-
		84/3	-	-	G	-	-	-	G	-	-	-
		84/3	-	G	-	-	-	-	G	-	T	-
		84/4	-	G	G	-	-	-	G	-	-	-

Nur in einer Probe aus der Urne 30 gelang der Nachweis der Haplogruppe H. Diese Probe zeigte in der Duplex ein mtDNA-Fragment, welches nicht reproduziert werden konnte. Ferner gelang der Nachweis einiger SNPs aus der Wiederholerprobe. Trotz mehrfacher Wiederholung der Analyse dieser Probe funktionierte die Amplifikation von Signalen kaum. Jedoch widersprechen sich die Signale, die detektiert werden konnten, nicht.

5.3.5.3 Verbrennungsgrad der Proben

Wurde der Verbrennungsgrad anhand der Knochenfarbe bestimmt, fiel auf, dass 18 der entnommenen Proben weiß aussahen und 23 Proben weiß-grau. Fünf Proben waren grau und nur eine Probe schwarz verbrannt. Dies lies die Schlussfolgerung zu, dass hier eine sehr gute Verbrennung stattgefunden hatte. Die drei Proben mit DNA-Signalen zeigten alle eine weiß-graue Verfärbung.

Der Überstand, der bei der Extraktion in den Lysis-Schritt eingesetzt wurde, hatte bei 45 Proben eine gelbe Farbe und in zwei Proben war er braun. Beide Proben mit braunen Überständen wurden auch in den anschließenden PCRs gehemmt.

5.3.6 Urnengräberfeld Scharbeutz

5.3.6.1 DNA-Ausbeute und Inhibition

Aus dem Gräberfeld Scharbeutz wurden 14 Urnen beprobt, von denen sechs Urnen bei der Entnahme noch verschlossen waren. Insgesamt erfolgte die Untersuchung von 163 Proben, unter denen sechs Zahnfragmente zu finden waren. Alle Proben durchliefen eine dreitägige EDTA-Behandlung und die Extraktion mit dem Spin Forensic Kit.

Mit der Screening-PCR fand die Testung aller Proben auf Hemmstoffe statt. Dabei wies dieses Gräberfeld die geringste Belastung von Inhibitoren auf. Nur 11,6 % der Proben wurden in der DNA-Analyse gehemmt.

Mitochondriale DNA konnte mittels Duplex-PCR in 28 Proben nachgewiesen werden. Drei Proben zeigten zusätzlich Signale für nDNA an. Um die Ergebnisse zu reproduzieren, erfolgte eine Wiederholung der Duplex-PCR mit den positiven Proben. Daraufhin amplifizierten nur noch 13 Proben ein Signal für mtDNA. Der Nachweis beider Signale funktionierte in keiner Probe mehr. Wenn noch genügend Knochenmaterial vorrätig war, wurde eine erneute Extraktion durchgeführt. Bevorzugt wurden dabei die Knochenproben, die auch in der zweiten Duplex-PCR Signale detektierten. Insgesamt wurden 13 Proben nochmals extrahiert, wovon drei Proben erneut mtDNA enthielten. Die sechs Zahnfragmente, alles Wurzelbereiche, enthielten keine DNA. Zu den noch sechs verschlossenen Urnen gehörten 19 der 28 Proben, die im ersten Durchlauf mtDNA Signale zeigten. Davon reproduziert in einer zweiten Duplex-PCR wurden acht Signale. Die drei Proben, die nach einer erneuten Extraktion wieder Signale detektierten, kamen aus den geschlossenen Urnen.

5.3.6.2 Nachweis der Haplogruppe mittels SNP-PCR

Auch hier wurden die Proben mit positiven DNA-Befunden in die SNP-Analyse eingesetzt. Die einzelnen Profile sind der Tabelle 31 zu entnehmen.

In der Tabelle sind die besten Ergebnisse je Probe dargestellt. Proben, bei denen nur die Amplifikation von weniger als vier Signalen gelang, wurden nicht mit aufgeführt, wenn diese Signale mit den anderen Proben der Urnen identisch waren.

Die Proben aus den Urnen 248, 38, 173 und 156 zeigten identische Profile innerhalb ihrer Beprobung. Eine Zuordnung der Haplogruppe gelang nur bei den Proben aus Urne 173. In der Probe 95/6 konnte mehrfach der SNP 12372A detektiert werden, sowie auch in den anderen Proben der Urne die SNPs 7028T und 14766T. Diese Ergebnisse ermöglichten die Einordnung in die Haplogruppe U. In den anderen Urnen konnte die Haplogruppe -trotz der

vielen amplifizierten Signale- nicht zugeordnet werden, weil das Signal für 12372 ausfiel. Dieses ist nötig, um zwischen fünf Haplogruppen zu unterscheiden. Ausgeschlossen werden konnte die Haplogruppe H, da in den Proben der SNP 7028T detektiert wurde.

Tab. 31: Ergebnisse der SNP-PCR zum Haplogruppennachweis bei den Leichenbrandproben.

Angegeben ist jeweils das beste Profil je Probe. Die Proben, bei denen in 8697 kein C steht, amplifizierten Thymin. Da dieses aber mit dem Artefakt deckungsgleich ist, kann nicht unterschieden werden, ob das Fragment (um den SNP herum) degradiert ist und deshalb kein Cytosin nachgewiesen werden konnte, oder ob das Signal für Thymin echt ist.

*: Urnen waren noch nicht geöffnet, E: Extraktionsnegativkontrolle, n: neu isolierte Proben, kleine Buchstaben: deutlich kleinere Signale.

	Urnen-Nr.	lfd. Nr.	7028	3010	1719	8251	8697	12372	13708	14766	14798	15904
	Bearbeiter		T	G	G	C	C	G	G	C	T	C
Urnengräberfeld Scharbeutz	162*	89/10	-	-	G	C	C	-	G	-	-	-
		89/12	-	-	G	T	C	-	G	-	-	-
	248*	92/1	T	G	G	C	-	G	G	T	T	G
		92/2	T	-	G	C	C	-	G	T	T	G
		92/3	T	-	G	-	C	-	G	-	-	G
		E 92	T	-	G	C	C	-	G	T	T	G
		92/2 n	T	-	G	C	C	-	G	T	T	G
	38	93/3	T	G	G	C	C	-	G	T	T	G
		93/4	-	-	-	C	C	-	G	-	-	G
		93/5	T	G	G	C	C	-	G	T	T	G
	133*	94/9	T	-	-	T/c	C	-	-	-	-	-
		94/11	T	-	G	C	C	-	G	T	T	G
	173*	95/1	T	G	G	C	-	-	G	T	T	G
		95/1n	-	G	G	C	C	-	G	T	T	G
		95/6	T	G	G	C	-	A	G	T	T	G
		95/8	T	G	G	C	-	-	G	T	T	G
	156	96/3	-	-	G	C	-	-	G	T	T	G
		96/8	T	-	G	C	-	-	G	-	-	G
		96/10	-	G	G	C	-	-	G	-	-	G
		96/11	T	G	G	C	T	-	G	T	-	G
	269*	97/2	T	-	G	-	-	-	G	C	T	G
		97/5	-	-	G	C	-	-	G	C	T	G
		97/6	C	-	G	C	-	-	G	-	-	G
		97/12	T	A/G	G	C	-	-	G	T	T	G
		97/13	C	G	G	-	-	-	G	T	T	G
	231	99/11	C	G	G	C	c	-	G	T	T	G
		99/12	T	G	G	C	C	-	G	T	T	G
		99/13	T	G	-	C	-	-	G	T	T	G
	171	100/2	T	G	G	C	-	-	G	C/T	T	G
	185	101/6	T	-	G	C/T	-	-	G	T	T	G

Bei den Proben aus den Urnen 162, 133, 269 und 231 traten widersprüchliche Ergebnisse zwischen den Proben auf; dies besonders gravierend bei den Proben aus Urne 269, die sich in zwei Position (7028, 14766) unterschieden. In den fünf Proben konnten drei verschiedene Haplotypen detektiert werden. Zudem traten in der Probe 97/12 bei der Position 3010 beide möglichen Signale auf, so dass die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination groß war. In der Probe 94/9 aus Urne 133 war an Position 8251 ein relativ starkes Signal für Thymin und ein schwaches für Cytosin vorhanden. In der anderen Probe aus dieser Urne wurde an dieser

Stelle Cytosin gebunden. Auch hier könnte das Thymin durch Kontamination eingetragen worden sein.

Bei den Proben aus den Urnen 171 und 185 schien auch eine Kontamination an den Positionen 14766 und 8251 vorzuliegen, da jeweils eine Probe dort beide möglichen Signale amplifizierte.

Insgesamt waren sich alle Proben relativ ähnlich. Da die Detektion des Signals für den SNP 12372 kaum bei den untersuchten Proben gelang, war eine Zuordnung der Haplogruppen -bis auf Urne 173- nicht möglich.

5.3.6.3 Verbrennungsgrad der Proben

Bei der Auswertung der Knochenfarbe zeigte der größte Anteil der Fragmente eine grau-weiße (35 %) Verfärbung, gefolgt von den Farben weiß-schwarz (18,4 %), weiß-grau-schwarz (16,6 %), schwarz (16,5 %), grau (8 %) und weiß (5,5%). Somit wiesen viele Knochenstücke, durch den hohen Anteil an dunkel kolorierten Stellen, auf eine unvollständige Verbrennung hin.

Beim Vergleich der 31 positiven DNA-Proben in Abhängigkeit zum Verbrennungsgrad stellte sich folgendes Bild dar: 41,9 % der Knochen sind weiß-grau-schwarz verbrannt, je 16,2 % weiß-schwarz und schwarz, sowie je 12,9 % grau und grau-weiß. Damit waren besonders die Knochen DNA-haltig, die sich durch Merkmale einer unvollständigen Verbrennung auszeichneten.

Die Farbe des Überstandes während des Lysis-Schrittes bei der Extraktion war in 82,2 % farblos und klar und in 17,8 % gelb.

5.3.7 Vergleich der Gräberfelder

5.3.7.1 Vergleich der Anzahl an gehemmten Proben

Alle 516 untersuchte Proben unterlagen der Testung auf das Vorhandensein von Inhibitoren. Am Beginn der Arbeit wurde dafür die Inhibitor-PCR und später die Screening-PCR eingesetzt. Es stellte sich eine Abhängigkeit der Inhibition von der verwendeten Extraktionsmethode heraus. Bei den Proben, deren Extraktion mit dem Forensic Kit und der zusätzlichen Proteinase K sowie einer anschließenden Aufreinigung durchgeführt wurde, trat der Anteil an gehemmten Proben am stärksten hervor. Als besonders schwer mit Inhibitoren belastet, erschien das Urnengräberfeld Süderbrarup. Die anderen drei untersuchten Gräberfelder wiesen in etwa den gleichen Grad an Hemmstoffen auf.

Ein deutlicher Unterschied, bezüglich der Anwesenheit von Inhibitoren, konnte mit der zweiten Extraktionsmethode erzielt werden. Zunächst erfolgte eine eintägige Dekalzifizierung mit EDTA und anschließend die Extraktion mit dem Spin Forensic Kit. Da dieses Kit bereits über ein Filtersystem verfügte, wurde auf eine anschließende Aufreinigung der Proben verzichtet. In allen vier untersuchten Gräberfeldern gelang die Senkung der Anzahl an inhibierten Proben. Teilweise trat gar keine Hemmung der Proben mehr auf. Da die -mit dieser Methode- untersuchte Probenmenge relativ klein war, lies sich nur feststellen, dass eine deutliche Besserung auftrat.

Eine dritte Methode wurde beim Gräberfeld Scharbeutz eingesetzt. Hier erfolgte eine dreitägige Dekalzifizierung der Proben. Bei diesem Gräberfeld wurden nur 11,6 % der 163 analysierten Proben gehemmt. Somit war diese Methode am besten für die Entfernung von Inhibitoren geeignet. Da die anderen Gräberfelder nicht dieser Methode unterzogen wurden, war ein direkter Vergleich nicht durchführbar. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass dieses Gräberfeld generell weniger von inhibitorischen Substanzen befallen war. Eine genaue Auflistung der Werte erfolgt in Tabelle 32.

Tab. 32: Prozentuale Angabe der hemmenden Proben pro Gräberfeld in Abhängigkeit zur Extraktionsmethode.
n.d.: nicht durchgeführt.

	Gremersdorf	Süderbrarup	Sörup II	Norderbrarup	Scharbeutz
Hemmung (Forensic Kit und Aufreinigung)	33,7 %	46,7 %	36 %	37,5 %	n.d
Hemmung (ein Tag EDTA, Spin Forensic Kit)	19,4 %	0 %	28,6 %	0 %	n.d.
Hemmung (drei Tage EDTA, Spin Forensic Kit)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11,6 %

5.3.7.2 Vergleich der DNA-Ausbeute

Der Nachweis von nukleärer und mitochondrialer DNA wurde mit der Duplex-PCR durchgeführt. Dabei konnte mit einer kommerziellen DNA-Linie (Female 232,2 µg/ml von Promega) eine Nachweisgrenze von 10 pg für nDNA und 100 fg für mtDNA erzielt werden. Bei einem Vergleich der DNA-Ausbeute mit der ersten Extraktionsmethode gelang der Nachweis von DNA in 17 von 217 Proben bei DNA-freien Negativkontrollen. Das entsprach einer Ausbeute von etwa 7,8 % für alle drei Gräberfelder. Sofern noch ausreichend Knochenmaterial für eine erneute Extraktion vorhanden war, erfolgte eine erneute Isolierung der Proben mit der dritten Extraktionsmethode. Hier konnten nur die mitochondrialen DNA-Fragmente reproduziert werden. Insgesamt gelang dies in 10 Proben. Auffallend war, dass in

den Proben von Norderbrarup mit der ersten Extraktionsmethode gar keine DNA nachzuweisen war.

Mit der zweiten Extraktionsmethode gelang der DNA-Nachweis in 20 von 96 Proben, was etwa 20,8 % der Proben entsprach. Eine Reproduktion des DNA-Gehaltes fand nur in vier Proben statt. Dieser geringe Wert basierte zum Teil darauf, dass bei einigen Proben nicht mehr genügend Knochenmaterial für eine erneute Extraktion zur Verfügung stand.

Das Knochenmaterial aus Scharbeutz, welches mit der dritten Extraktionsmethode bearbeitet wurde, zeigte in 31 Proben Signale. Drei der Proben detektierten sogar beide Signale in der Duplex-PCR. Somit amplifizierten insgesamt 19 % der Proben Signale für DNA. Die Reproduktion durch eine erneute Duplex-PCR funktionierte nur in 13 Proben. Die wiederholte Extraktion der Proben -mit genügend Knochenmaterial- reproduzierte nur in drei Proben die Werte für DNA. Eine Übersicht über die Einzelwerte gibt die Tabelle 33 an.

Im Ganzen war die DNA-Ausbeute in allen Gräberfeldern sehr gering. Nur wenige Ergebnisse ließen sich reproduzieren. Beim Vergleich der Werte nach der jeweiligen Erst-Extraktion (ohne Reproduktion) wiesen die Gräberfelder Sörup II und Norderbrarup mit etwa 4 % und 6,4 % die schlechtesten Werte auf. In Gremersdorf und Süderbrarup lagen die Werte etwa bei 12 % und 14 %. Scharbeutz erreichte einen Wert von 19 %. Bei allen Gräberfeldern war meist nur mitochondriale DNA vorhanden und reproduzierbar. Die nukleäre DNA konnte in keinem Fall erneut nachgewiesen werden. Anhand dieser Werte sind Sörup II und Norderbrarup für weitere molekulargenetische Untersuchungen als ungeeignet einzustufen.

Tab. 33: DNA-Ausbeute der einzelnen Gräberfelder in Abhängigkeit zur Extraktionsmethode.

EM: Extraktionsmethode.

	Gremersdorf	Süderbrarup	Sörup II	Norderbrarup	Scharbeutz
Proben insgesamt	108	127	71	47	163
Proben in 1. EM	77	90	50	40	nicht durchgeführt
DNA-Ausbeute mit 1. EM	5x mtDNA	5x mtDNA 2x nDNA 3x nDNA+mtDNA	2x nDNA	keine DNA nachweisbar	
reproduziert mit 3.EM	4x mtDNA	5x mtDNA	1x mtDNA		
Proben in 2. EM	31	37	21	7	nicht durchgeführt
DNA-Ausbeute mit 2. EM	8x mtDNA	8x mtDNA	1x mt DNA	2x mtDNA 1x nDNA	
reproduziert mit 3.EM	2x mtDNA	1x mtDNA		1x mtDNA	
DNA-Ausbeute mit 3. EM	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt	28x mtDNA 3x nDNA+mtDNA
reproduziert in 2. Duplex					13x mtDNA
reproduziert mit 3. EM					3x mtDNA

5.3.7.3 Vergleich der SNP-Analysen

Insgesamt wurden Proben aus 25 Urnen erfolgreich getestet. Es konnte den Proben aus neun Urnen eine Haplogruppe zugewiesen werden. Drei Individuen gehörten der Haplogruppe H und eine davon der Haplogruppe H1 an. Vier weitere Individuen waren zur Haplogruppe U und jeweils einer zur Haplogruppe K bzw. zur Haplogruppe Pre-V zuzuordnen. Die Bearbeiterin im Labor war ebenfalls zur Haplogruppe Pre-V zuzurechnen. Somit war eine direkte Kontamination nur bei den Proben einer Urne denkbar. Die Haplogruppe U war bei den Mitarbeitern aus dem DNA-Labor nicht vertreten und kam in der Belegschaft nur bei etwa 8 % der Mitarbeiter vor, die aber keine Zutrittsberechtigung zum DNA-Bereich hatten.

Generell zeigte sich bei der Analyse der SNPs, dass die Signale an den Positionen 12372 und 3010 sehr oft ausfielen. Des Weiteren wurde auf die Angabe des SNPs 8697 in den Tabellen verzichtet, wenn das Signal nicht eindeutig Cytosin amplifizierte. Durch die Artefaktbildung war bei stark degradierten Proben die Unterscheidung zwischen Ausfall des Signals für Cytosin und der Echtheit des Signals für Thymin nicht möglich.

Bei einigen Proben konnten Mischprofile festgestellt werden. Diese Abweichungen traten bei fünf Proben innerhalb einer Amplifikation wie z.B. bei Probe 100/2 (Scharbeutz) auf. Bei fünf Urnen gab es Unterschiede zwischen den Proben wie z.B. Urne 406 (Gremersdorf). Überwiegend stark betroffen waren die Urnen aus Scharbeutz. Insbesondere die Urne 269 wies einige Unstimmigkeiten auf. Keine Unterschiede zeigten die Proben aus Norderbrarup und Sörup II, was auch auf die geringe Anzahl von DNA-haltigen Proben zurückgeführt werden könnte.

Abschließend ist einzuschätzen, dass eine direkte Kontamination nur durch einen Bearbeiter, aufgrund der unterschiedlichen Haplogruppenzuordnung der einzelnen Urnen, ausgeschlossen werden kann. Am erfolgreichsten gelang die Einteilung der Haplogruppen bei den Proben aus Süderbrarup (siehe Tabelle 34). Die schlechtesten Ergebnisse dagegen lieferte Scharbeutz. Obwohl dort am häufigsten der Nachweis von DNA in den Proben gelang, war die Einordnung in eine Haplogruppe nur bei den Proben aus einer Urne gegeben.

Tab. 34: Übersicht der Urnen, denen eine Haplogruppe zugeordnet werden konnte.

Gräberfeld	Urne	Haplogruppe
Gremersdorf	208	K
	410	Pre-V
Süderbrarup	729	U
	809	U
	291	H1
Sörup II	81	U
	160	H
Norderbrarup	30	H
Scharbeutz	173	U

5.3.7.4 Vergleich des Verbrennungsgrades

Beim Vergleich der fünf Gräberfelder bezüglich des Verbrennungsgrades, stellte sich heraus, dass die Proben aus Süderbrarup, Sörup II und Norderbrarup einen sehr hohen Anteil (82 % - 89 %) an weiß und grau-weiß verbrannten Knochen aufzeigten. Bei den Proben aus Gremersdorf waren 55 % der Knochen weiß bzw. grau-weiß verbrannt. Dagegen wiesen nur 40 % der Knochenfragmente aus Scharbeutz diese Färbung auf. Eine Weißfärbung der Knochen lies auf eine Verbrennungstemperatur von über 800 °C schließen. Bei der Betrachtung der Anteile an grau und schwarz verkohlten Knochen ergab sich, das Gremersdorf und Scharbeutz mit 27,7 % bzw. 24,5 % führend im Vergleich mit den anderen drei Gräberfeldern (zwischen 7 % und 13 %) waren. Somit konnte gesagt werden, dass die Leichenbrände aus Gremersdorf und Scharbeutz nicht so gleichmäßig und gut verbrannt worden sind, wie die Leichenbrände aus Süderbrarup, Sörup II und Norderbrarup. Auch ließen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass die Verbrennungstemperatur meist unter 800 °C gelegen hatte. Die Tabelle 35 zeigt die einzelnen Prozentwerte der unterschiedlichen Farbnuanen der einzelnen Gräberfelder.

Tab. 35: Vergleich der Färbung der Knochen der einzelnen Gräberfelder.

Farbe	Gremersdorf	Süderbrarup	Sörup II	Norderbrarup	Scharbeutz
weiß	23,1 %	36,2 %	42,2 %	38,3 %	5,5 %
weiß-grau	32,4 %	46,5 %	46,6 %	48,9 %	35 %
weiß-grau-schwarz	5,7 %	3,1 %	-	-	16,6 %
weiß-schwarz	11,1 %	3,9 %	4,2 %	-	18,4 %
grau	12,1 %	7,9 %	5,6 %	10,6 %	8 %
schwarz	15,6 %	2,4 %	1,4 %	2,2 %	16,5 %

5.3.7.5 Einfluss des Verbrennungsgrades auf die DNA-Ausbeute

Bei der Auswertung der Proben mit erfolgreich amplifizierter DNA in der Duplex-PCR fiel auf, dass besonders Leichenbrände, die weiß-grau-schwarz verbrannt waren, den größten Anteil an DNA-haltigen Knochen enthielten. Meist waren diese Knochen auf der äußeren Oberfläche weiß, auf der inneren Oberfläche grau und an den Bruchkanten und damit im Inneren schwarz verbrannt. Als zweite Gruppe waren die weiß-schwarz verbrannten Knochenproben zu nennen. Diese Ergebnisse zeigten, dass Knochen mit Anzeichen einer unvollständigen Verbrennung eher DNA enthielten als weiße oder graue, die bereits vollständig verbrannt waren. Die einzelnen Werte sind der Tabelle 36 zu entnehmen.

Tab. 36: Proben mit positivem DNA-Befund in Abhängigkeit zu ihrer Verbrennung.

Farbe	Gremers- dorf	Süder- brarup	Sörup II	Norder- brarup	Scharbeutz	alle Gräber- felder	insgesamt
weiß	2 (1,6 %)	6 (4,7 %)	-	-	-	8 (6,3 %)	128 (100 %)
weiß-grau	4 (1,9 %)	9 (4,3 %)	3 (1,5 %)	3 (1,5 %)	4 (1,9 %)	23 (11,1 %)	207 (100 %)
weiß-grau- schwarz	1 (2,7 %)	-	-	-	13 (35,1 %)	14 (37,8 %)	37 (100 %)
weiß- schwarz	2 (4 %)	3 (6 %)	-	-	5 (10 %)	10 (20 %)	50 (100 %)
grau	-	-	-	-	4 (8,9 %)	4 (8,9 %)	45 (100 %)
schwarz	4 (8,2 %)	-	-	-	5 (10,2 %)	9 (18,4 %)	49 (100 %)
insgesamt	13	18	3	3	31	68	516

5.4 Molekulargenetische Analysen an Brandleichen

5.4.1 Quantität und Qualität der DNA abhängig vom Verbrennungsgrad

5.4.1.1 Quantitätsbestimmung mittels Duplex-PCR

Alle 71 Knochenproben der Brandleichen wurden vorab mit der beschriebenen Duplex-PCR analysiert. Die typischen PCR-Ergebnisse für jedes untersuchte Verbrennungsstadium sind exemplarisch in Abbildung 31 dargestellt. Die Fläche unter den Signalen wurde in relativen Fluoreszenzeinheiten (rfu) mit Hilfe der Software Gene Scan 3.1.2 gemessen. Die Durchschnittswerte für alle Amplifikationen wurden berechnet und sind der Abbildung 32 zu entnehmen.

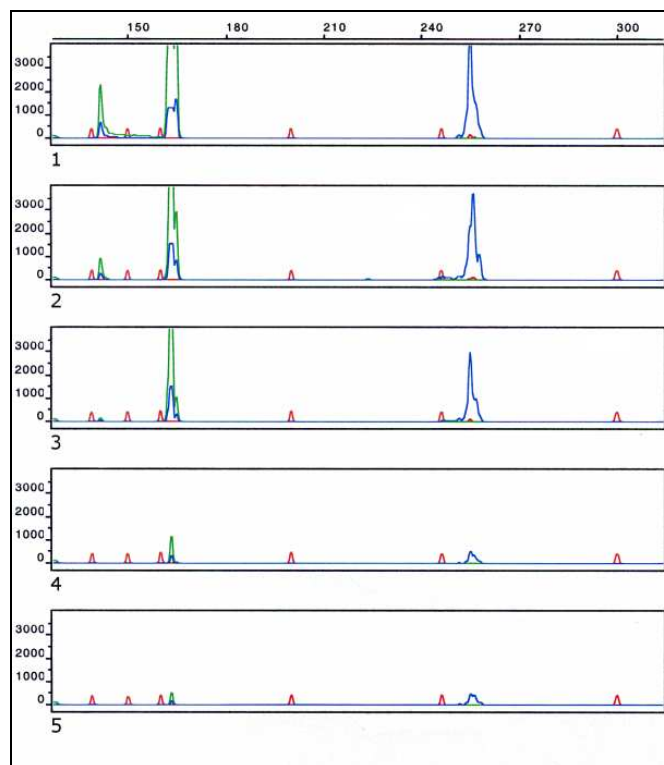


Abb. 31: Ergebnisse der Duplex-PCR.

Elektropherogramme nach der automatischen Fragmentanalyse auf einem ABI 310. Dargestellt sind die typischen Ergebnisse der nukleären (grün) und mitochondrialen (blau) DNA-Signale der einzelnen Gruppen. **1:** kaum verbrannt, **2:** halb verbrannt, **3:** schwarz verbrannt, **4:** blau-grau verbrannt, **5:** blau-grau-weiß verbrannt.

In der Gruppe I (kaum verbrannt) gab es keine Schwierigkeiten, spezifische DNA-Signale für ein nukleäres und mitochondriales Signal zu erhalten. Im Durchschnitt wurden in dieser Gruppe 122.322 rfu für das nukleäre Signal und 106.128 rfu für das mitochondriale Signal erreicht. In der Gruppe II, der halbverbrannten Knochen, lagen die Werte etwas niedriger. So konnten im Durchschnitt für das nukleäre Fragment 95.083 rfu und 87.413 rfu für das mtDNA-Fragment erzielt werden. Die 26 schwarzverbrannten Knochenproben aus Gruppe III

detektierten im Durchschnitt 27.490 rfu für das nukleäre Signal und 35.544 rfu für das mitochondriale Signal. Die Gruppe IV, bestehend aus zehn blau-grau verbrannten Knochen, wies noch Durchschnittswerte von 17.340 rfu für das nukleäre Fragment und 21.029 rfu für das mitochondriale Fragment auf. Jedoch zeigten insgesamt von den zehn Proben der Gruppe nur vier Proben Signale. Von diesen vier Proben amplifizierten nur zwei Proben Signale für beide Fragmente. Die anderen sechs Proben detektierten Komplettausfälle in beiden Signalen, so dass in dieser Gruppe die DNA-Menge als stark reduziert angesehen werden konnte. In Gruppe V, der blau-grau-weiß verbrannten Knochen, ist die DNA-Menge erwartungsgemäß noch geringer ausgefallen. Nur in zwei der acht Knochenproben gelang es, überhaupt DNA zu amplifizieren. Der Durchschnittswert in dieser Gruppe lag für nDNA bei 7.481 rfu und 7.161 rfu für mtDNA.

Insgesamt waren die Ergebnisse der Duplex-PCR durch einen erwarteten Abfall der Signalintensität gekennzeichnet.

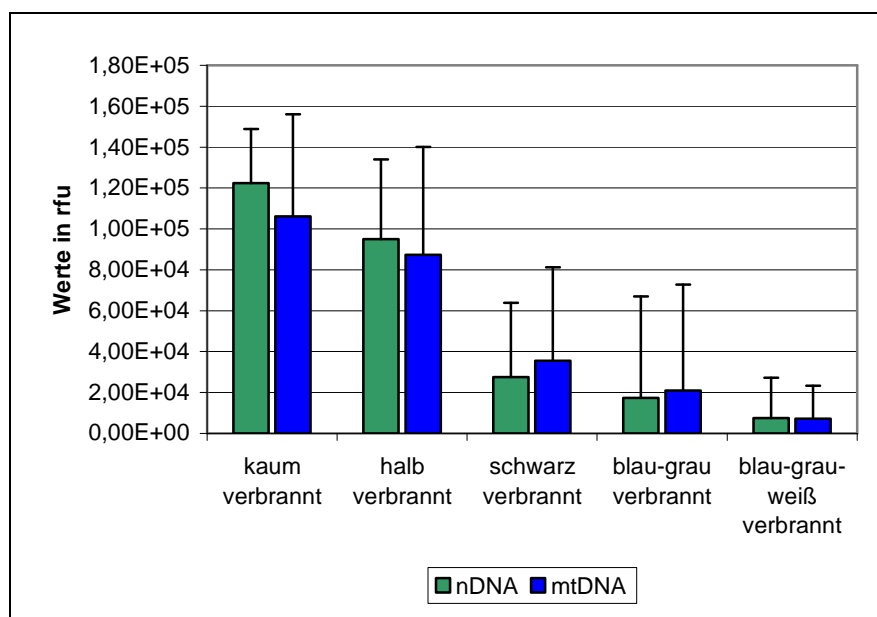


Abb. 32: Mittelwerte der Duplex-PCR der einzelnen Verbrennungsgrade mit ihrer Standardabweichung.

5.4.1.2 Qualitätsbestimmung mittels Screening-PCR

Auch diese PCR wurde für alle 71 Knochenproben angewendet. In Abbildung 33 sind die typischen Elektropherogramme nach der Detektion der PCR-Produkte auf einem ABI Prism 310 dargestellt. In Abbildung 34 ist die schematische Darstellung der Ergebnisse ersichtlich. Aus allen Proben der Gruppe I (kaum verbrannt) und II (halb verbrannt) gelang der Nachweis eines vollständigen Profils. In einzelnen Fällen fiel das Signal für die mitochondriale DNA aus. Nachdem die PCR mit einer geringeren DNA-Menge wiederholt wurde, konnte ebenso bei diesen Proben ein vollständiges Profil analysiert werden. Auch die Ergebnisse der

Duplex-PCR und der Sequenzierung bestätigten die Anwesenheit von mitochondrialer DNA in diesen Proben.

Die Ergebnisse aus Gruppe III (schwarz verbrannt) wiesen ein sehr heterogenes Bild auf. Einige Proben detektierten ein volles Profil, während andere einen Komplettausfall der Systeme verzeichneten. Wie erwartet, fielen die Signale für die DNA-Proben aus Gruppe IV und V häufig nach der Amplifikation komplett aus. Nur in wenigen Proben gelang der Nachweis einzelner Systeme. Diese Teilprofile konnten nur bei 38,9 % der Proben aus beiden Gruppen zusammen amplifiziert werden. Jedoch war es in 25 % der Proben noch möglich, das Geschlecht mittels Amelogeninnachweis zu bestimmen.

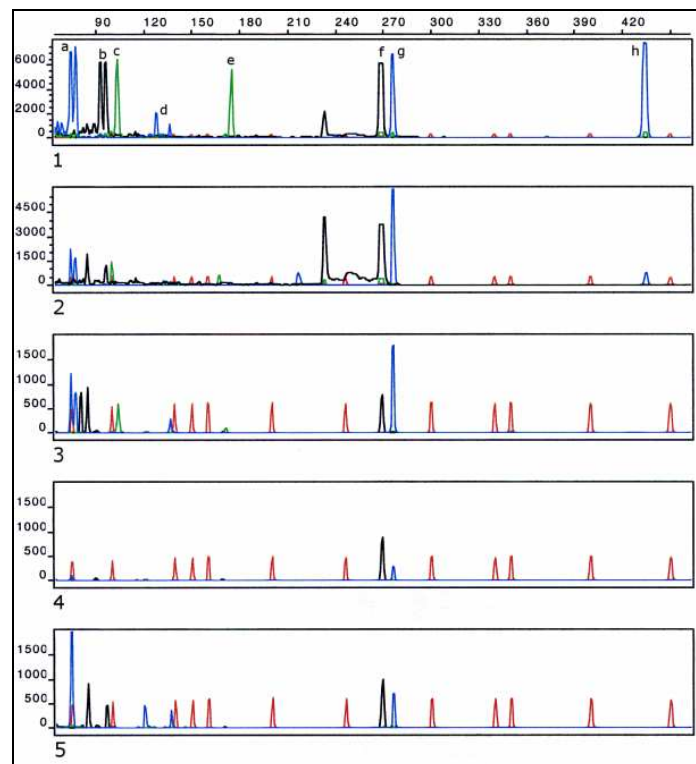


Abb. 33: Elektropherogramme der Screening-PCR nach der Elektrophorese auf einem ABI Prism 310.

Typische Ergebnisse der einzelnen Gruppen. 1: kaum verbrannt, 2: halb verbrannt, 3: schwarz verbrannt, 4: blau-grau verbrannt, 5: blau-grau-weiß verbrannt. Die Buchstaben stehen für die untersuchten Marker: (a) Amelogenin, (b) TH01, (c) DYS391, (d) vWA, (e) DYS390, (f) PCR-Inhibitor-Tester, Hydra, (g) mtDNA 280 bp, (h) mtDNA 439 bp.

In allen Proben konnte das Hydra-Fragment amplifiziert werden, wodurch eine Inhibition der Proben ausgeschlossen werden konnte. Somit waren alle negativen Ergebnisse auf einen Verlust an amplifizierbarer DNA zurückzuführen.

Auch bei den Ergebnissen dieser PCR kam es zu dem erwarteten Ausfall einzelner Signale bis hin zum Komplettausfall bei zunehmender Verbrennung der Knochen. Die unerwartet guten Werte für die Gruppen IV und V stammten alle von einer Person. Die anderen Proben wiesen überwiegend Komplettausfälle auf. Auch zeigte sich, dass das 280 bp große mitochondriale

Fragment noch bei sehr stark verbrannten Knochen häufiger amplifiziert werden konnte als das längere mitochondriale Fragment. Dieses Bild ist typisch für degradierte DNA.

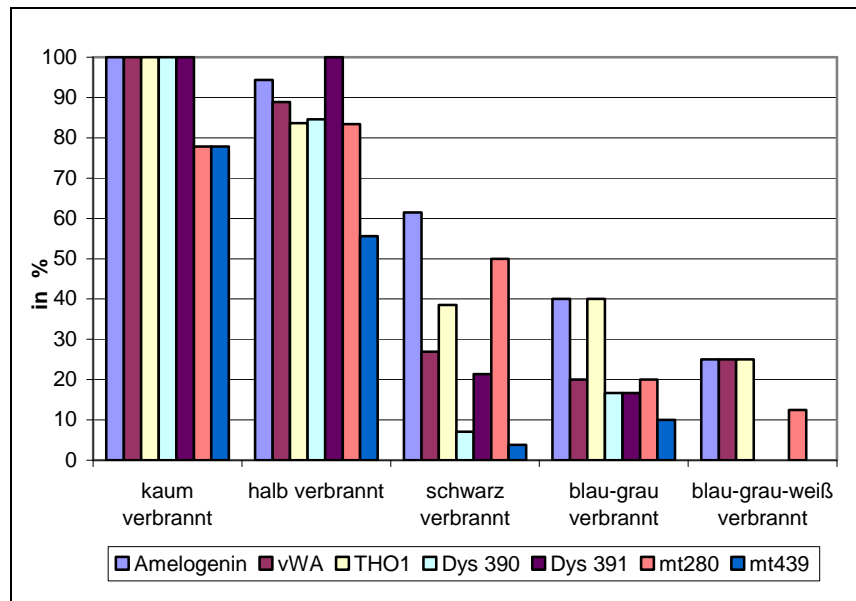


Abb. 34: Ergebnisse der Screening-PCR für die fünf untersuchten Gruppen (schematisch).

5.4.2 Identifizierung über STR-Typisierung abhängig vom Verbrennungsgrad

In die STR-Analyse wurden nur Proben eingesetzt, die positive Signale für nukleäre DNA in der Duplex-PCR und / oder Screening-PCR aufwiesen. Insgesamt traf das auf 59 von 71 Knochenproben zu. Für die Auswertung wurden nur Systeme gezählt, deren Allele kein drop out detektierten und deren Signalhöhe mindestens 200 rfu umfasste. Die deutsche Spurenkommission empfiehlt eine reproduzierbare Signalhöhe von 50 rfu, wenn das Rauschen der Grundlinie gering ist und die Zyklenzahl nicht erhöht wird [Schneider et al. 2009]. In dieser Studie wurde dennoch eine relativ hohe Signalhöhe festgelegt, weil die Identifiler-PCR mit sechs Zyklen mehr, als vom Hersteller angegeben, durchgeführt wurde. Anschließend wurden die analysierten Profile mit denen aus Blut oder Organen der verschiedenen Brandleichen abgeglichen. Falls dies -aufgrund der starken Verbrennung- nicht mehr möglich war, geschah die Überprüfung der Profile mit denen aus dem Vergleichsmaterial. Das ermöglichte einen einfachen Nachweis von Allel drop ins oder Allel drop outs. Nach der Auswertung wurden die Proben in fünf Gruppen eingeteilt, A bis E, abhängig von ihrer Anzahl an korrekten Allelen. Der Nachweis von Amelogenin wurde dabei als STR-System gewertet, obwohl es laut Definition kein STR-System ist. Die Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Abbildung 35 dargestellt.

Wie die Vortests schon andeuteten, bereitete es keine Schwierigkeiten, authentische Vollprofile aus den Proben der Gruppe I (kaum verbrannt) zu erhalten. Nur eine Probe zeigte

weniger als 14 STRs und gehörte somit zu Gruppe B (Nachweis von 13-10 STRs). Möglicherweise lag das nicht an der Hitze und der damit induzierten DNA-Degradation, sondern vielmehr an der zu großen Menge DNA in dieser Probe. Ohne Berücksichtigung der Signalhöhe konnte auch in dieser Probe ein vollständiges Profil generiert werden.

Ähnliche Ergebnisse wiesen auch die Proben aus Gruppe II (halb verbrannt) auf. Viele Proben (83,3 %) amplifizierten Profile mit 16-14 STR-Systemen (einschließlich Amelogenin) und 13-10 STRs, während von 3 Proben (16,7 %) nur 9-6 STR-Systeme detektiert werden konnten.

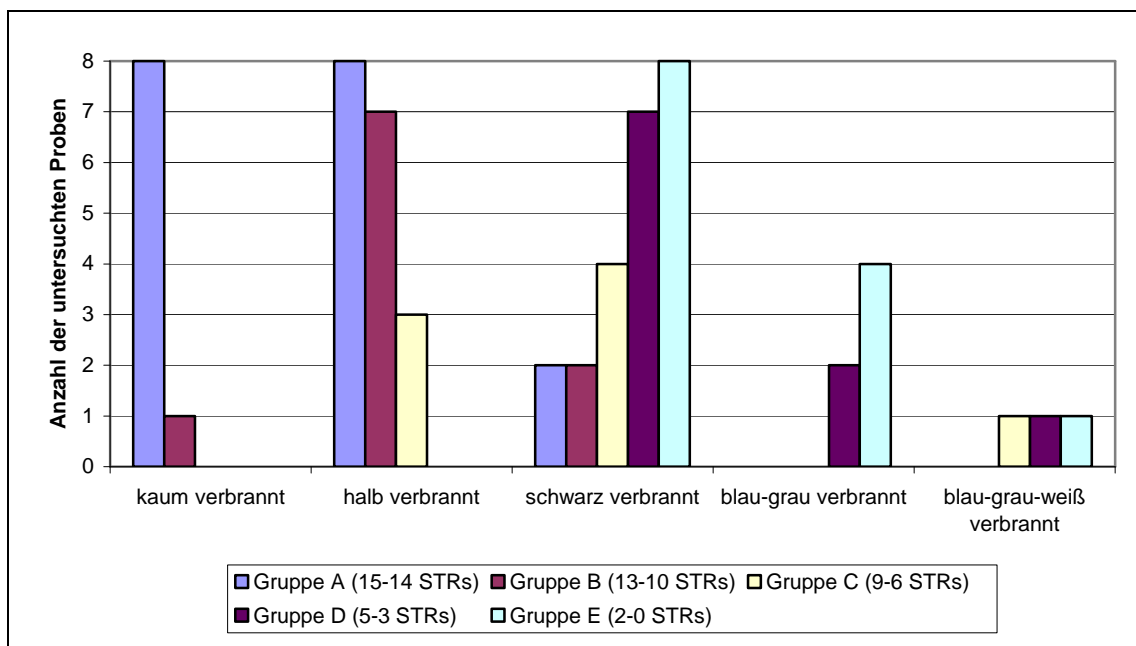


Abb. 35: Schematische Darstellung der Ergebnisse der STR-Analyse mittels Identifiler der fünf Verbrennungsstadien.

Die Ergebnisse von Gruppe III (schwarz verbrannt) zu Gruppe II dagegen zeigten einen beachtlichen Sprung. Auch bei dieser Analysemethode erwies sich Gruppe III als eine sehr variable Gruppe: Vom vollständigen Profil bei 8,7 % der Proben bis hin zum vollständigen Allel drop out bei 34,8 % war jede STR-Gruppe vorhanden. In einigen Proben gelang noch der Nachweis von 5-3 bzw. 2-0 korrekten STR-Systemen.

In den Gruppen IV (blau-grau verbrannt) und V (blau-grau-weiß verbrannt) konnten nur noch Profile mit 5-3 oder 2-0 vollständigen STR-Systemen detektiert werden. Nur in einer Probe aus Gruppe V gelang es, ein relativ gutes Profil mit 9-6 STRs zu amplifizieren.

Die Knochenproben, die durch relativ gute Signale in den Verbrennungsstadien blau-grau und blau-grau-weiß gekennzeichnet waren, stammten alle von der gleichen Brandleiche, die auch in der Screening-PCR gute Signale amplifizierte. Mehr Einzelheiten zum Verbrennungsgrad sind den Tabellen 4 und 5 unter Fallnummer fünf zu entnehmen.

5.4.3 Identifizierung über Sequenzierung der mtDNA abhängig vom Verbrennungsgrad

Speziell in diese Analysemethode wurden nur Proben eingesetzt, die Signale für mtDNA in den Vortests aufwiesen. Die spezifischen Fragmente zum Nachweis eines 220 bp und eines 439 bp großen Fragments der HVI-Region wurden amplifiziert und auf einem ethidiumbromidhaltigem 2 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Bei der Auswertung wurden alle Proben gezählt, die ein ausreichend starkes Signal für eine nachfolgende Sequenzierung aufzeigten. Die Einteilung der Signalstärken in starke oder schwache Banden erfolgte subjektiv nach Erfahrung der Bearbeiterin. Schwache Banden, die nicht mehr für eine Sequenzierung ausgereicht hätten, wurden nicht mit gewertet. Beispielhaft ist in Abbildung 36 ein Agarosegel zu erkennen, auf dem die PCR-Produkte für das 220 bp lange Fragment einer Brandleiche aufgetragen wurden.

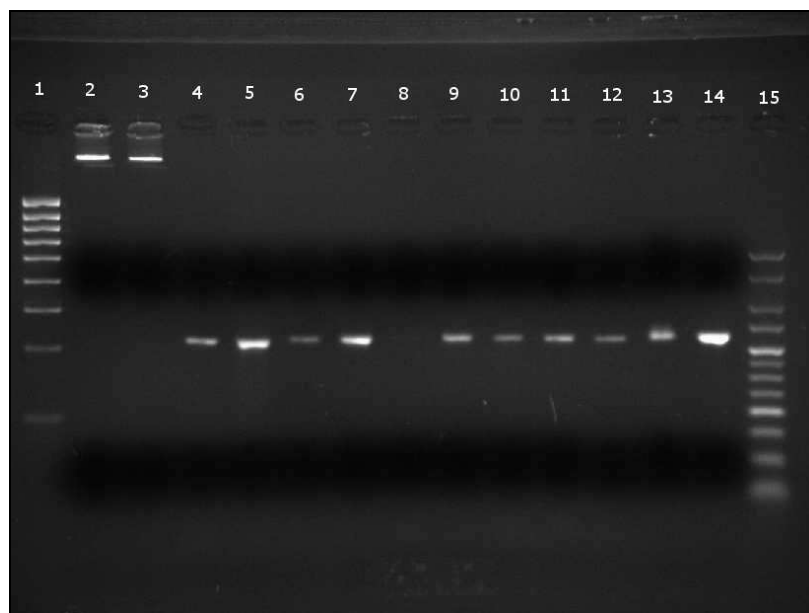


Abb. 36: 2 % Agarose-Gel mit den Sequenzierungsprodukten eines 220 bp langen Fragments der HVI-Region von Fall fünf.

1: Hyperladder I, 2: 200 ng Standard DNA, 3: 100 ng Standard DNA, 13-14: kaum verbrannte Knochenproben, 5 und 10: halb verbrannte Knochenproben, 6, 8, 11-12: schwarz verbrannte Knochenproben, 4 und 7: blau-grau verbrannte Knochenproben, 9: blau-grau-weiß verbrannte Knochenproben, 15: Hyperladder V.

Insgesamt erfolgte die Auswertung der PCR-Produkte von 64 Proben mit einem 220 bp langen Fragment und 56 Proben mit einem 439 bp langen Fragment. Eine Übersicht über den Amplifikationserfolg beider Fragmente in den untersuchten Proben gibt Tabelle 37.

Tab. 37: Ergebnisse der Sequenzierungs-PCR.

Gezeigt sind die Prozentwerte mit positiven Signalen auf dem Agarosegel von jedem untersuchten Verbrennungsstadium.

	kaum verbrannt	halb verbrannt	schwarz verbrannt	blau-grau verbrannt	blau-grau-weiß verbrannt
erfolgreich amplifiziertes 220 bp Signal	100 %	100 %	80 %	40 %	28 %
erfolgreich amplifiziertes 439 bp Signal	100 %	77,8 %	57,1 %	0 %	0 %

In der Gruppe I und II waren starke Signale für beide mitochondrialen Fragmente kennzeichnend. Im Vergleich zur STR-Analyse zeigte sich in der Gruppe I keine bessere Ausbeute, jedoch in der Gruppe II. Hier wurden bei zwei Proben nur neun und zehn STR-Systeme amplifiziert aber starke Signale in der Sequenzierung eines 220 bp mtDNA-Fragments festgestellt.

Die schwarz verbrannten Knochenproben repräsentierten auch bei der Sequenzierung wieder ein sehr heterogenes Bild. Nach der Zugabe von 5 µl DNA-Lösung in die Amplifikations-PCR zeigten fünf Proben in der Sequenzierung bessere Ergebnisse im Vergleich zu den entsprechenden STR-Ergebnissen. In sechs Proben waren die Ergebnisse kongruent, bei weiteren sechs Proben waren die STR-Systeme erfolgreicher als die Sequenzierung. Wenn nur 1 µl DNA-Lösung in die Amplifikations-PCR eingesetzt wurde, dann zeigten 16 Proben in der Sequenzierung bessere Ergebnisse als in der STR-Analyse und sechs Proben lieferten kongruente Ergebnisse. Dabei wurde die Probe als schlechter gewertet, wenn sie ein starkes Signal auf dem Agarosegel nach der Amplifikations-PCR und weniger als 10 STR-Systeme aufwies. Die unterschiedlichen Gesamtzahlen ergaben sich aus der Tatsache, dass mehr Proben mit 1 µl DNA-Lösung sequenziert wurden als mit 5 µl.

Bei den beiden stark-verbrannten Gruppen (IV und V) waren die Ergebnisse besser oder identisch im Vergleich zu den STR-Profilen. Von den zusammen zwölf untersuchten Proben aus beiden Gruppen gelang bei vier Proben der Nachweis eines 220 bp Fragments. Von diesen vier erfolgreich amplifizierten Proben gehörten drei zu der bereits oben erwähnten Brandleiche. Das 439 bp große Fragment konnte in keiner der beiden stark verbrannten Gruppen nachgewiesen werden.

5.4.4 Identifizierung durch Bestimmung der mtHaplogruppe abhängig vom Verbrennungsgrad

In die SNP-Analyse wurden alle Proben eingesetzt, von denen noch genügend Material zur Verfügung stand und die in der Duplex-PCR Signale für mtDNA aufwiesen. Zusätzlich wurden noch acht Proben aus Gruppe IV und V analysiert, die keine mtDNA in den Vortests amplifizierten. Diese dienten als Kontrolle, weil die SNP-Analyse sensibler als die Vortests war. Insgesamt konnten 59 Proben in die Auswertung einbezogen werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 37 graphisch dargestellt.

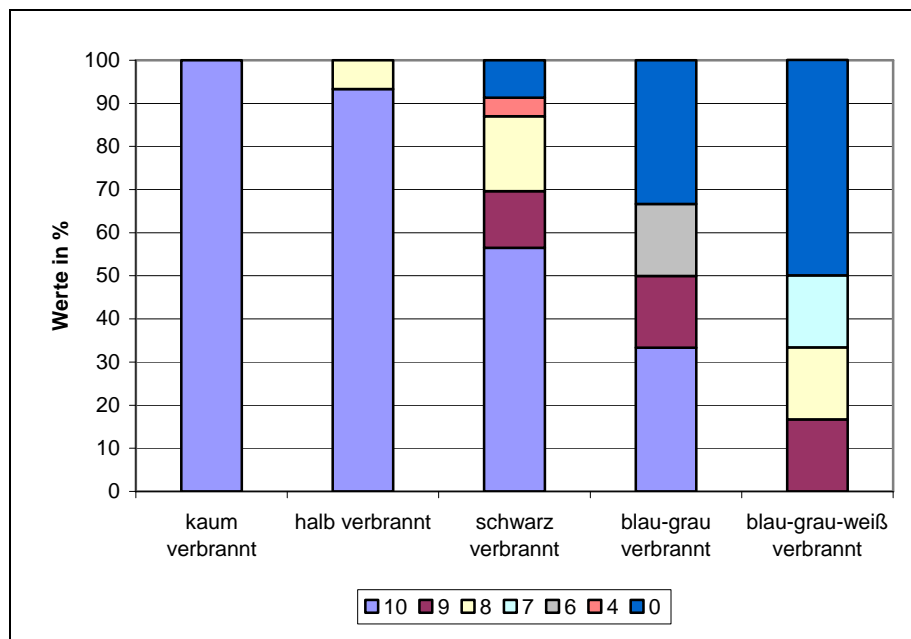


Abb. 37: Schematische Darstellung der Ergebnisse nach der SNP-Analyse.

Die Legende gibt die Anzahl der erfolgreich typisierten SNPs wieder. Auf der X-Achse sind die Verbrennungsgrade aufgetragen und auf der Y-Achse sind die Werte der erfolgreich amplifizierten SNPs in Prozent angegeben.

Die Zuordnung einer Haplogruppe gelang in den Gruppen I (kaum verbrannt) und II (halb verbrannt) fast immer. Nur eine Probe mit acht nachgewiesenen SNPs in Gruppe II konnte keiner Haplogruppe zugeordnet werden, weil die Signale für 7028 und 3010 ausfielen. Im Vergleich mit den weiteren Proben von dieser Brandleiche waren die anderen amplifizierten Signale identisch.

Von den 23 Proben aus der Gruppe III (schwarz verbrannt) gelang es bei 19 Proben (82,6 %) die Haplogruppe zu bestimmen. Nicht möglich war dies, außer bei den beiden Proben ohne Signale, bei der Probe mit vier und bei einer der Proben mit acht Signalen.

In den Gruppen IV und V gelang die Zuordnung der Haplogruppe noch in fünf Fällen (41,7 %). Bei weniger als sieben SNPs war dies nicht mehr möglich. Von den Kontrollen (ohne mtDNA in den Vortests) wurde in einer Probe ebenfalls der Nachweis der Haplogruppe

erfolgreich durchgeführt. In zwei Proben gelang der Nachweis von sechs und sieben Signalen. In fünf Proben kam es weiterhin zu einem Komplettausfall aller Signale.

Im Vergleich der Proben zu den Fällen traten keine Unstimmigkeiten auf. Alle ermittelten Signale aus den Proben, die zu einer Brandleiche gehörten, sind identisch. Es ergab sich folgende Verteilung der Haplogruppen bei den 13 untersuchten Brandleichen: Acht Brandleichen konnten der Haplogruppe H zugeordnet werden, wovon zwei der Untergruppe H1 angehörten; jeweils eine Person gehörte zur Haplogruppe K bzw. U und zwei waren der Überhaplogruppe preV zuzurechnen. Bei einer Brandleiche gelang die Zuordnung in eine Haplogruppe nicht. Diese Knochenproben waren sehr stark verbrannt (Gruppe IV und V); es konnten nur wenige Signale amplifiziert werden, die keine Einteilung zuließen.

Im Vergleich mit der Sequenzierung des 220 bp großen mtDNA-Fragments detektierten die SNPs bessere Ergebnisse. So hätten nur 33,3 % der Proben aus Gruppe IV und V erfolgreich sequenziert werden können. Jedoch gelang die Einteilung in eine Haplogruppe noch bei 41,7 % der Proben. Bei den anderen Gruppen sind die Ergebnisse im Vergleich fast identisch. Somit zeigten die SNPs -besonders bei stark degradierten Proben- eine höhere Erfolgsquote als eine Sequenzierung eines 220 bp mtDNA-Fragmentes.

5.5 Molekulargenetische Analysen an fäulnisveränderten Leichen

5.5.1 Relative Quantifizierung des DNA-Gehaltes mittels Duplex-PCR

Nach der Extraktion erfolgte der Einsatz aller Rippenproben sowie einiger Gewebeproben in die Screening-PCR, um zu überprüfen, ob Hemmstoffe in der Probe vorhanden waren. Bei allen Proben konnte dies ausgeschlossen werden. Bei einigen Proben gelang die Amplifikation des Hydra-Signals nicht, aufgrund der großen Menge an DNA, da die humanen Signale in diesen Proben alle detektiert wurden. Auch bei den zufällig ausgewählten Gewebeproben war keine Inhibition feststellbar.

Anschließend wurden die Proben in die Duplex-PCR eingesetzt. Die Fälle acht und neun aus Tabelle 6 konnten nicht mehr in der Duplex-PCR analysiert werden, da die Proben-DNA auch in der Routine verwendet wurde und anschließend nicht mehr genügend Material zu Verfügung stand. Deshalb erfolgte die Analyse mittels Duplex-PCR nur an Proben von 30 Leichen.

In den Abbildungen 38 und 39 sind die Ergebnisse aus der Duplex-PCR graphisch dargestellt. Bei den beiden Individuen der Kontrollgruppe konnte weder bei den Signalen für die nukleäre

DNA noch für die mitochondriale DNA Unterschiede zwischen den Geweben festgestellt werden. Allerdings war diese Kontrollgruppe aufgrund der geringen Anzahl an Proben nicht repräsentativ. Rippen standen aus diesen Fällen nicht zur Verfügung.

Auch in der Gruppe beginnende Fäulnis gelang es, nur zwei Fälle in die Untersuchung einzubeziehen. Lediglich das Muskelgewebe lag von beiden Personen zur Untersuchung vor. Alle anderen drei Gewebe waren jeweils nur von einer Person vorhanden. Trotzdem wurden diese Werte mit in die Untersuchung einbezogen. Die besten Ergebnisse lieferte die Rippenprobe für beide Signale in der Duplex-PCR. Gute Resultate erbrachten auch die Niere und das Muskelgewebe. Ein relativ schwaches Signal wurde für die nukleäre DNA aus der Aorta erzielt. Da nur eine Aorta zur Analyse in dieser Gruppe vorlag, ist der Wert nicht repräsentativ.

In der Gruppe fortgeschrittene Fäulnis erfolgte die Analyse an 22 Gewebestücken, die auf sieben Personen zurückzuführen waren. Hier erzielte das Muskelgewebe die besten Ergebnisse. Allerdings konnten auch die anderen Gewebe gute Ergebnisse vorweisen.

Bei den elf hochgradig fäulnisveränderten Leichen mit 46 Proben unterschieden sich die Ergebnisse für die mitochondriale DNA kaum voneinander. Bei der nukleären DNA war ein Abfall der Signalstärke, zwischen den Gruppen fortgeschrittene und hochgradige Fäulnis, zu beobachten. Bei den Signalen für die mitochondriale DNA war dieser nicht so stark wahrnehmbar.

Die Gruppe höchstgradige Fäulnis mit acht untersuchten Individuen zeigte die besten Ergebnisse für nukleäre DNA bei den Rippen. Die Werte für Muskelgewebe, Aorta und Niere unterschieden sich kaum und die Signale für die Leber hatten einen so geringen Durchschnittswert, dass er in der Grafik kaum darstellbar war. Die mitochondriale DNA detektierte sehr gute Ergebnisse für Rippen und Muskelgewebe und gute für Niere und Aorta. Auch hier wies das Lebergewebe die schlechtesten Ergebnisse auf.

Mit Hilfe dieser PCR gelang der Nachweis, dass Rippen und Muskelgewebe die besten Ergebnisse in der Quantität der DNA aufwiesen. Die genauen Werte, die für die Grafik repräsentant waren, sind in Tabelle 38 aufgelistet.

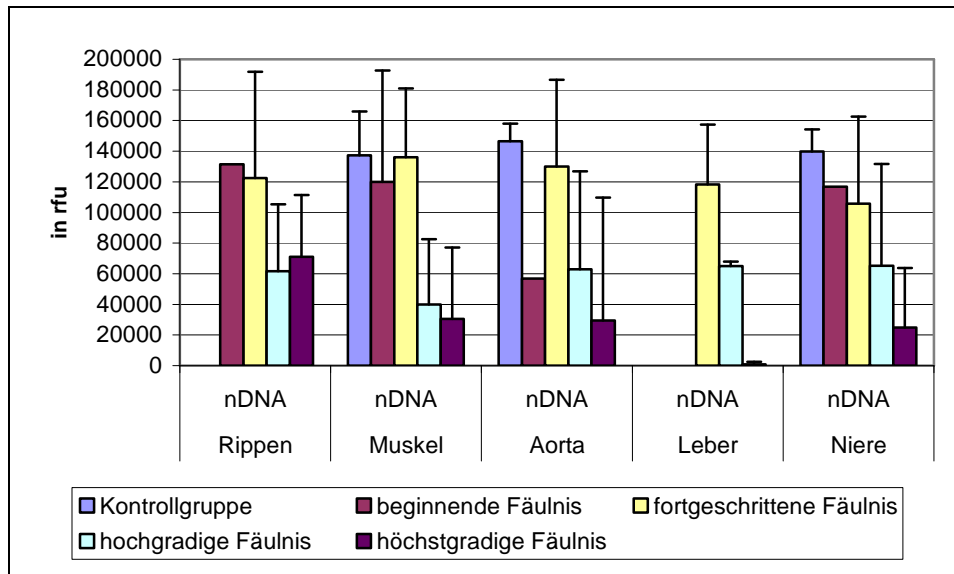


Abb. 38: Verteilung der durchschnittlich erreichten relativen Fluoreszenzeinheiten für nukleäre DNA der einzelnen Gewebe in der Duplex-PCR mit den entsprechenden Standardabweichungen.

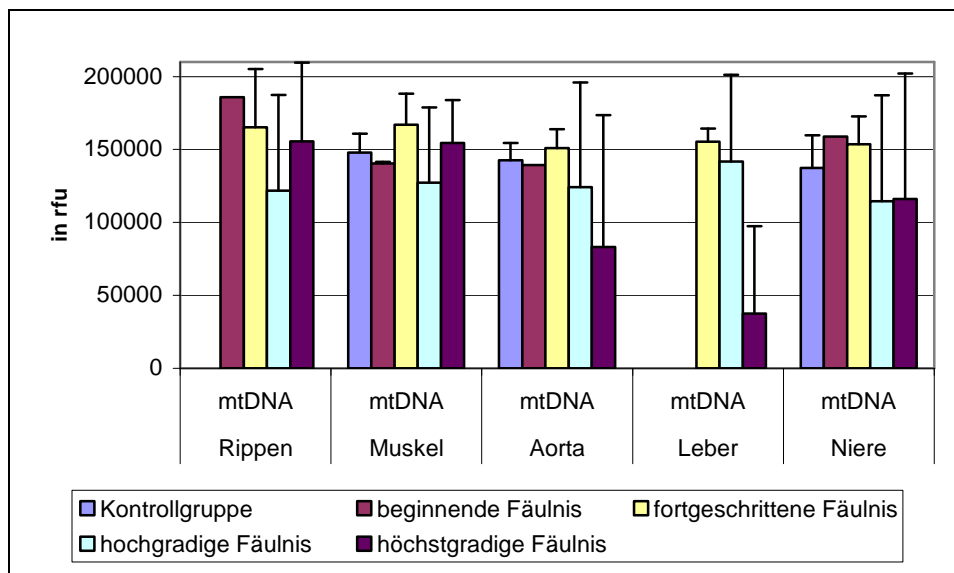


Abb. 39: Verteilung der durchschnittlich erreichten relativen Fluoreszenzeinheiten für mitochondriale DNA der einzelnen Gewebe in der Duplex-PCR mit den entsprechenden Standardabweichungen.

Tab. 38: Durchschnittswerte der Signalstärke in rfu nach der Duplex-PCR.

Gewebe		Kontrollgruppe	beginnende Fäulnis	fortgeschrittene Fäulnis	hochgradige Fäulnis	höchstgradige Fäulnis
Rippen	nDNA		131474	122551	61672	71114
	mtDNA		185859	165303	121775	155644
Muskel	nDNA	137390	119984	136116	40009	30428
	mtDNA	147857	140334	166934	127194	154440
Aorta	nDNA	146511	56942	130037	62877	29470
	mtDNA	142535	139407	150959	124286	83091
Leber	nDNA			118193	64966	813
	mtDNA			155332	141830	37427
Niere	nDNA	139866	116837	105810	65229	24841
	mtDNA	116837	158820	153524	114512	115982

5.5.2 Absolute Quantifizierung des DNA-Gehaltes mittels Realtime-PCR

Mit Hilfe einer Realtime-PCR mit dem Quantifiler-Kit (Applied Biosystems) wurde der DNA-Gehalt der Rippenproben untersucht. Die Analyse der einzelnen Proben erfolgte in Doppelbestimmung.

Die Analyse ergab einen DNA-Gehalt von 24,2 ng für die eine Rippenprobe der Gruppe beginnende Fäulnis. Bei den Proben mit fortgeschrittener Fäulnis wurde ein Durchschnittswert von 45,2 g erreicht (siehe Abb. 40). Die Rippe von Fall 13 aus Tabelle 6 zeigte dabei einen sehr geringen DNA-Gehalt von 0,0357 ng. Die anderen drei Probenwerte lagen zwischen 31 und 90 ng. In den Proben der hochgradig fäulnisveränderten Leichen wurde ein Durchschnittswert von 6,3 ng für die Rippen gemessen. Allerdings war diese Gruppe sehr heterogen, d.h. die Werte schwankten von 0 bis 36 ng. In drei Proben gelang die Detektion von nDNA nicht mehr. Die Gruppe der höchstgradig fäulnisveränderten Leichen erreichte eine Durchschnitts-DNA-Menge von 0,15 ng. Ein Wert wurde dabei nicht berücksichtigt. Die Rippe aus Fall 31 aus Tabelle 6 sollte laut Messungen 533,1 ng DNA enthalten. Da der mitgeführte Standard nur maximal 200 ng/µl beinhaltete, war dieses Ergebnis wahrscheinlich ungenau gemessen und nicht bei der Durchschnittswerteberechnung berücksichtigt worden.

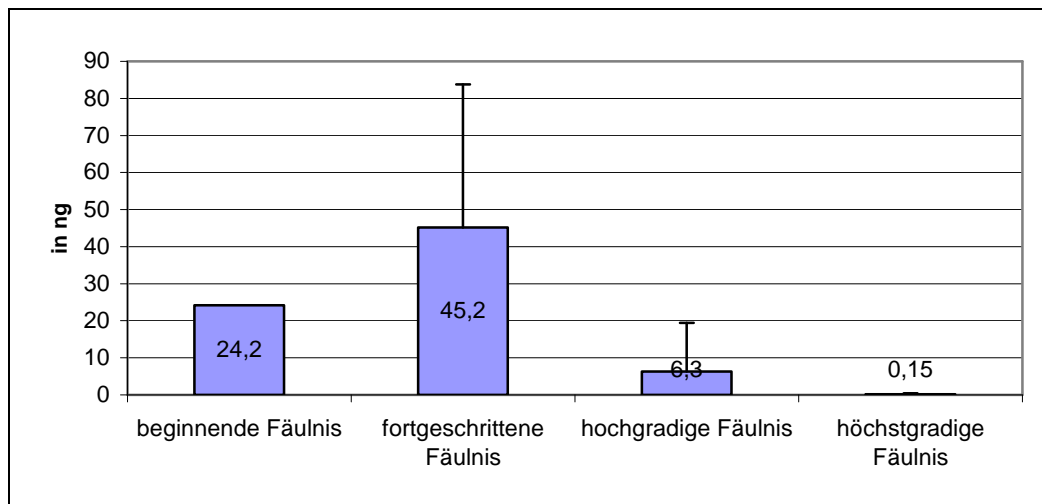


Abb. 40: Mittlerer DNA-Gehalt der Rippenproben aus den einzelnen Gruppen nach der Realtime-PCR mittels Quantifiler-Kit. Zusätzlich ist die Standardabweichung der Werte dargestellt.

Aus jeder Gruppe erfolgte stellvertretend die Untersuchung eines Falls, bei denen auch die Organe auf die DNA-Menge hin überprüft wurden. Die Werte sind der Tabelle 39 zu entnehmen. Die Rippen und Organe liefen in Doppelbestimmung in der Realtime-PCR, so dass sie mit den gleichen Standardkurven berechnet wurden. Es zeigte sich, dass die Rippen bei hoch- und höchstgradigen Fäulnisveränderungen noch DNA in relativ großen Mengen

enthielten. Auch das Muskelgewebe wies noch genügend DNA für eine erfolgreiche STR-Analyse auf. Am geringsten war die gemessene DNA-Menge in den Aortaproben in dieser Stichprobe.

Tab. 39: Angabe der DNA-Mengen (in ng) der einzelnen Organe im Vergleich zur Rippe.
In Klammern sind die Fallnummern aus Tab. 6 angegeben.

	beginnende Fäulnis (4)	fortgeschrittene Fäulnis (11)	hochgradige Fäulnis (19)	höchstgradige Fäulnis (26)
Rippe	24,2	90,3	13,2	0,66
Muskel	5,77	1,17	0,0795	0,127
Aorta		0	0,1055	0
Leber		0	0,4195	0,1145
Niere	130,55	0	0,127	0,00715

5.5.3 Identifizierung über STR-Typisierung abhängig vom Fäulnisgrad

Für die STR-Analyse kam die DNA-Lösung in unterschiedlichen Verdünnungen in den AmpFℓSTR® Identifier™ zum Einsatz. Bei der Auswertung fanden nur Profile mit den besten Ergebnissen Berücksichtigung. Außerdem wurden nur Signale mit Höhen über 200 rfu gezählt und das System durfte kein Allel drop out aufweisen. Dies wurde durch Vergleiche der Profile untereinander sichergestellt. Ebenso wurde, wie bei der Auswertung der Brandleichen, das Amelogenin-System als 16. System gewertet und mit ausgezählt. Die Ergebnisse sind der Abbildung 41 zu entnehmen.

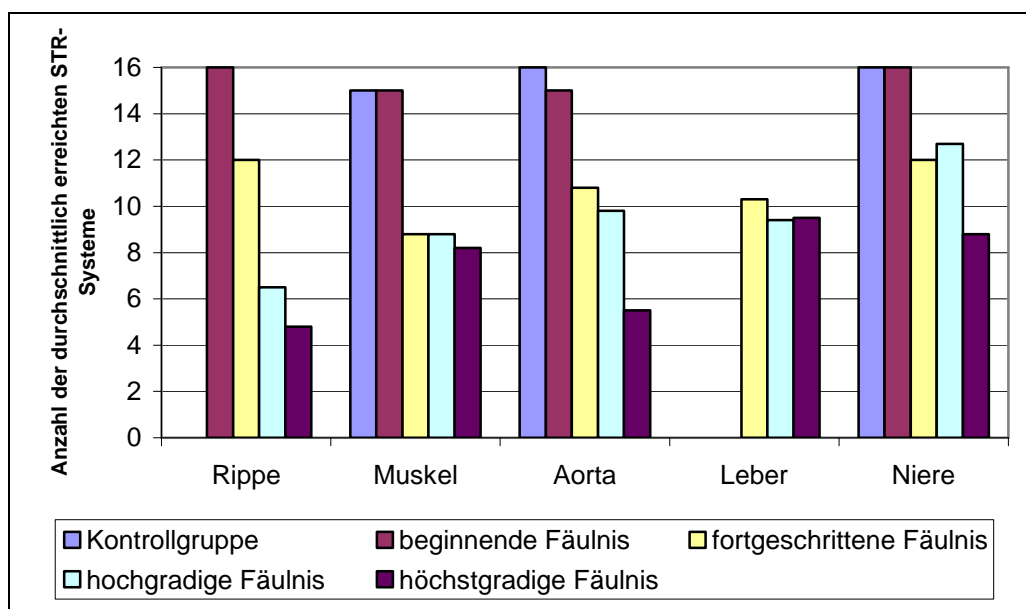


Abb. 41: Durchschnittliche Anzahl der erreichten vollständigen STR-Systeme mit Signalen über 200 rfu.

Wie erwartet, gelang es, bei der Kontrollgruppe als auch bei der Gruppe beginnende Fäulnis in allen untersuchten Organen, fast vollständige Profile zu amplifizieren. Die Anzahl von 15 bis 16 STRs hätte für eine sichere Identifizierung ausgereicht. In der Gruppe fortgeschrittene Fäulnis erfolgte bei den Organen die Amplifikation von etwa acht bis zwölf STR-Systemen. Hier zeigten die Nierenproben die besten Ergebnisse. Auffallend waren die schlechten Resultate der Rippen, in den Gruppen hoch- und höchstgradige Fäulnis. Die Aortaproben zeigten einen starken Abfall, in der Anzahl der erfolgreich amplifizierten Systeme, zwischen den Gruppen hoch- und höchstgradige Fäulnis. Die DNA-Qualität der Rippen- und Aortaproben wies innerhalb der Gruppen hoch- und höchstgradige Fäulnis starke Schwankungen auf, so dass sowohl fast vollständige Profile als auch Komplettausfälle aller Systeme amplifiziert werden konnten. Die Muskel-, Leber- und Nierenproben dagegen zeigten in diesen Gruppen Durchschnittswerte um die acht Systeme. Damit wäre eine Identifizierung möglich und unter Umständen auch die Eingabe in die Datenbank des Bundeskriminalamtes.

Bei der Auswertung fiel auf, dass viele Systeme Signale kleiner als 200 rfu aufwiesen. Daraufhin erfolgte eine zweite Auswertung mit der Auszählung aller Signale, die deutlich zu erkennen waren, unabhängig von der Signalthöhe. Weiterhin wurden die falsch homozygoten Signale nicht mit ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 42 dargestellt.

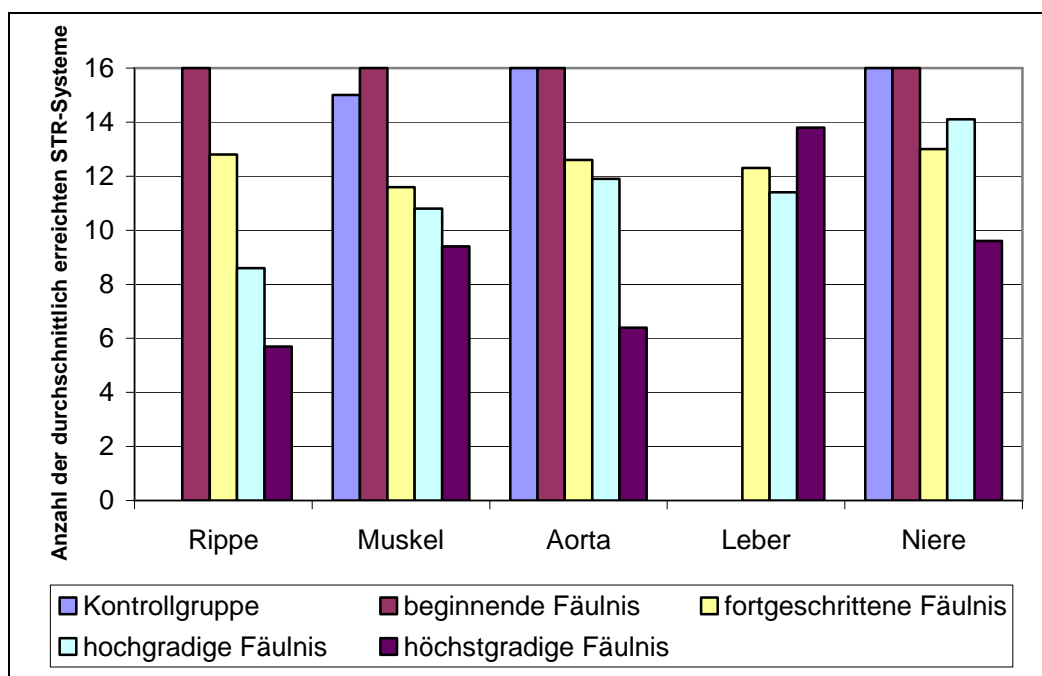


Abb. 42: Durchschnittliche Anzahl der vollständig analysierten STR-Systeme ohne Berücksichtigung der Signalthöhe.

Ein Vergleich mit den Ergebnissen der vorangegangenen Auswertung zeigte, dass alle untersuchten Proben bessere Werte lieferten. Selbst die Rippen detektierten etwa sechs STRs in der Gruppe höchstgradige Fäulnis.

Im Ganzen erbrachten die Nieren- und Leberproben die besten Ergebnisse in der STR-Analyse. Aber auch die Aorta- und Muskelgewebeproben wiesen eine ausreichende Menge an DNA für die Typisierung auf. Schlechte Ergebnisse dagegen boten die Rippenproben. In allen untersuchten Gruppen amplifizierten sie die wenigsten STR-Signale.

Vergleichend mit den Quantifizierungsergebnissen der Rippen aus der Realtime-PCR erwiesen die STR-Analyse gleiche Ergebnisse. Wenn die Proben keine detektierbare DNA-Menge mehr enthielten, konnten auch keine STR-Profile mehr amplifiziert werden.

5.5.4 Identifizierung über Sequenzierung der mtDNA abhängig vom Fäulnisgrad

Proben mit ausreichender Menge an DNA wurden in die Sequenzier-PCR eingesetzt. Dabei erfolgte die Amplifizierung eines 439 bp langen mtDNA Fragments. Die PCR-Produkte wurden anschließend auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen. Vorrangig sind die Proben der Gruppen hoch- und höchstgradig fäulnisveränderten Leichen analysiert worden, da davon auszugehen war, dass die anderen Proben keine Schwierigkeiten bei der Amplifikation erwarten ließen. Ebenso, wie bei den Sequenzierprodukten der Brandleichen, wurde die Signalstärke subjektiv in stark oder schwach eingestuft. Die Ergebnisse sind der Tabelle 40 zu entnehmen.

Tab. 40: Ergebnisse der Sequenzierungs-PCR nach Amplifikation eines 439 bp großes mtDNA-Fragments.

Gezeigt sind die Prozentwerte mit positiven Signalen auf dem Agarosegel von den Gruppen hochgradige Fäulnis und höchstgradige Fäulnis.

	Rippe	Niere	Aorta	Leber	Muskel
hochgradige Fäulnis	85,7 %	83,3 %	83,3 %	100 %	80 %
höchstgradige Fäulnis	100 %	100 %	83,3 %	100 %	100 %

Es zeigte sich, dass in fast allen Proben erfolgreich das 439 bp mtDNA-Fragment nachgewiesen werden konnte. Bei den Gruppen, die die 100 % nicht erreicht hatten, fiel immer nur eine Probe aus. Durch die relativ kleinen Gruppengrößen war die Schwankung der Ergebnisse erklärbar. Die Leberproben zeigten die besten Ergebnisse, weil jede Probe ein Signal lieferte und die Aortaproben die schlechtesten, da in beiden Fäulnisgraden jeweils eine Probe ausfiel.

6 Diskussion

Genetische Variationen, gleich ob Sequenz- oder Längenpolymorphismen, bilden die Grundlage zur Unterscheidung der einzelnen Individuen. Die Diagnostik dieser Variationen ist dadurch ein wesentlicher Bereich in der Rechtsmedizin geworden. Aus diesem Grunde wurde eine SNP-Analyse zur Bestimmung der mitochondrialen Haplogruppen etabliert. Ferner wird in dieser Arbeit versucht, mit bereits etablierten als auch mit neuen Methoden aus besonders stark degradiertem Material von Leichenbränden, Brandleichen und fäulnisveränderten Leichen, so viel Informationen wie möglich für eine Identifizierung zu erhalten. Des Weiteren wurden verschiedene Möglichkeiten zur Entfernung von Kontaminationen ausgetestet. An dieser Stelle sollen die einzelnen Ergebnisse diskutiert werden.

6.1 Nachweis von SNPs in der forensischen Praxis

6.1.1 Etablierung der SNP-Analyse zur Bestimmung mitochondrialer Haplogruppen

6.1.1.1 Auswahl der verwendeten Methode für die SNP-Analyse

Im Laufe der letzten Jahre sind verschiedene Methoden veröffentlicht worden, mit denen einzelne Nukleotidpolymorphismen im mtDNA-Genom nachgewiesen werden können. Dabei werden in der Literatur diverse Methoden vorgestellt, die die detektierten Ergebnisse unterschiedlich auswerten, z.B. über die Massenspektrometrie [Braun et al. 1997] oder über unterschiedliche Formen der Elektrophorese. Einen guten Überblick über die derzeitigen Methoden liefern Butler [2005], Budowle [2004a], Budowle et al. [2004b] sowie Landegren et al. [1998]. Trotz der Vielzahl an bereits etablierten Methoden werden noch weitere veröffentlicht, wie der Nachweis von SNPs mittels „... mini-primer allele-specific amplification with universal reporter primers for identification ...“, [Asari et al. 2009]. Hierbei handelt es sich um ein Verfahren, bei dem in der ersten PCR lokus-spezifische Primer (mit einem universellen Sequenz-Ende am 3'Ende) eingesetzt werden. In der zweiten PCR kommen universelle fluoreszenzmarkierte Primer zum Einsatz. Damit kann die Elektrophorese direkt, ohne zusätzliche Aufreinigungen, durchgeführt werden.

In dieser Arbeit wurde die Methode des „Minisequencing“ mit dem SNaPshot Kit ausgewählt. Für diese Methode sind keine zusätzlichen Geräte notwendig, da die Auswertung über eine Kapillarelektrophorese erfolgt und diese in jedem forensischen Routinelabor etabliert ist [Vallone et al. 2004]. Des Weiteren besitzt die Methode die Fähigkeit, mehrere SNPs gleichzeitig in einer Reaktion zu amplifizieren, weshalb sie ebenfalls gut für die Forensik geeignet ist [Norton et al. 2002]. und sie kann als zuverlässige und reproduzierbare Technik für forensische Anwendungen genutzt werden [Morley et al. 1999]. Da seit Beginn des zweiten Jahrtausends das Minisequencing mit Hilfe des SNaPshot-Kits durchgeführt werden kann, ist eine Standardisierung ermöglicht, so dass etwaige individuelle Unterschiede ausgeschlossen werden können.

6.1.1.2 Auswahl und Design der Primer

Für die Etablierung der SNP-PCR für stark degradierte Proben sollten Sequenzpolymorphismen des mitochondrialen Genoms untersucht werden. Die mtDNA kann auch noch in Proben enthalten sein, die keine nukleäre DNA mehr aufweisen. Der Grund dafür ist die Existenz einer großen Anzahl von Mitochondrien pro Zelle [Madigan et al. 2002, Kadenbach et al. 1995, Bogenhagen & Clayton 1974]. Dadurch ist die Chance sehr hoch, selbst in stark degradierten Proben noch mtDNA zu amplifizieren. So spielt die SNP-Analyse auch eine bedeutende Rolle bei Massenkatastrophen, wo die Opfer z.B. nicht mehr vollständig im anatomischen Verbund vorliegen [Biesecker et al. 2005]. Durch eine SNP-Analyse können schnell Ausschlüsse zugeordnet werden [Brandstätter et al. 2006].

Des Weiteren bietet die mtDNA die Möglichkeit für Populationsstudien. Da sie rein mütterlich vererbt wird [Bär et al. 2000], werden Mutationen von Generation zu Generation weitergegeben und die evolutionäre Geschichte kann daraufhin rekonstruiert werden. Außerdem kann der Nachweis einer mütterlichen Verwandtschaftslinien, (z.B. an Gräberfeldern) aufgezeigt werden, womit gegebenenfalls archäologische Fragestellungen zu beantworten sind.

Die benutzten Primersequenzen wurden der Literatur entnommen [Quintans et al. 2004, Brandstätter et al. 2003 und 2006] oder von PD Dr. Poetsch zur Verfügung gestellt. Bis auf die Studie von Brandstätter et al. [2006] sind alle Primer auch für degradierte oder geringe Mengen an DNA eingesetzt worden.

Alle verwendeten SNPs liegen im kodierenden Bereich der mtDNA. So können auch Proben unterschieden werden, die in den HV-Regionen identisch sind. Zwar weist der kodierende Bereich der mtDNA eine vierfach geringere Mutationsrate als der nichtkodierende Bereich

auf, jedoch ist er auch 15 mal größer und kann demzufolge zusätzliche Sequenzvariationen enthalten [Coble et al. 2004].

Soweit bis zur Fertigstellung der Arbeit bekannt, gibt es keine Hinweise darauf, dass die untersuchten SNPs für Krankheiten oder Phänotypen kodieren. Nur der SNP 13708 zeigt laut einer Studie einen leichten Schutzeffekt gegen Parkinson bei Frauen und älteren Personen [Brandstätter et al. 2003]. Auch der SNP 3010 wird häufig in der Literatur diskutiert. Dennoch ist bisher keine Krankheit oder andere Manifestation bekannt [Coble et al. 2004, Vallone et al. 2004]. Brandstätter et al. [2003] achteten zusätzlich darauf, dass die Polymorphismen keinen Einfluss auf die Funktion zeigten. Sie verwendeten stille Mutationen an der dritten Stelle eines Kodons. Zudem geben Accetturo et al. [2006] zu bedenken, dass haplogruppenspezifische Polymorphismen in einer Population weit verbreitet sind und schon seit tausenden von Jahren dem Selektionsdruck unterliegen. Daher können Haplogruppenmarker maximal nur eine untergeordnete Rolle bei krankheitskodierenden SNPs spielen.

Einige Extensionprimer wurden in ihrer Länge verändert, insbesondere bei der Etablierung der Haplogruppen-PCR. Da diese in der Literatur ursprünglich mit zwei Multiplex-PCRs und noch mehr SNPs beschrieben wurden, sind die verwendeten Primer für eine einzelne Multiplex-PCR angepasst worden.

6.1.1.3 Entwicklungsstufen der Multiplex-PCRs zum Nachweis der Haplogruppen

Der erste Schritt bei der Untersuchung der relevanten SNPs zur Haplogruppenbestimmung war die Kontrolle, ob alle verwendeten Primer einzeln korrekt funktionierten. Dabei wurden zunächst die vorgegebenen Primerkonzentrationen aus den Veröffentlichungen genutzt. Es stellte sich heraus, dass einige Extensionsprimer keine deutlichen Signale produzierten. Diese wurden nochmals neu bestellt und HPLC aufgereinigt. Wie in Tabelle A3 ersichtlich, konnten deutlich bessere Signale amplifiziert werden. Auch Brandstätter et al. [2006] haben die Extensionsprimer einer HPLC-Aufreinigung unterzogen und zusätzlich noch entsalzt. Auf diesen Schritt wurde in dieser Arbeit verzichtet.

Anschließend wurden die detektierten Größen der einzelnen Primer mit den tatsächlichen Größen verglichen. Die Oligonukleotide sind nach der Kapillarelektrophorese immer etwas länger als ihre tatsächliche Länge. Diese Längendifferenz bewegte sich in einem Rahmen von ca. 5 ± 2 bp, wobei gleiche Oligonukleotide jedoch in allen Auswertungen um das gleich Maß zu lang erscheinen. Zusätzlich sind auch die Längen eines Oligonukleotids mit unterschiedlich farbmarkierten ddNTPs um etwa 1-2 bp versetzt. So ist zum Beispiel das

Signal für 7028C in der H-Unterhaplogruppen-PCR 29 bp lang und das Signal für 7028T 31 bp. Der entsprechende Primer hat eine Länge von 25 Basenpaaren. Infolgedessen müsste eigentlich das Signal bei 26 Basenpaaren liegen. Erklärbar ist dies durch die elektrophoretische Mobilität, abhängig von der Länge, der Sequenz und der benutzten Farbe bei der diese Abweichungen auftreten können. Zusätzlich sind kürzere Oligonukleotide davon stärker betroffen als längere [Quintans et al. 2004].

Nachdem die Signale der einzelnen Singleplex-PCRs alle deutlich im Elektropherogramm zu erkennen und die genauen Positionen bekannt waren, wurden sie in die Multiplex-PCR eingesetzt. Für die H-Unterhaplogruppenbestimmung waren zwei Multiplex-PCRs geplant. Dadurch konnten die Primer für die SNPs so zusammengestellt werden, dass alle Signale deutlich erkennbar waren. Bei der Multiplex-PCR zur Bestimmung der westeuropäischen Haplogruppen erfolgte nur eine Anpassung der Konzentrationen.

Für die Austestung kamen sieben DNA-Proben von Mitarbeitern des DNA-Labors zur Anwendung. Diese unterschieden sich in ihrer HVI/II-Region voneinander. Damit sollte sichergestellt werden, dass sie auch zu unterschiedlichen Haplogruppen gehörten und die ausgewählten SNPs beide möglichen Variationen anzeigten. Indem immer die gleichen DNA-Proben benutzt wurden, war die eingesetzte DNA-Menge bei den einzelnen Primern immer in etwa gleich. Infolgedessen konnten die einzelnen Konzentrationen der Primer gut eingestellt werden.

Insgesamt ist der verwendete SnaPshotKit sehr gut für Multiplex-PCRs geeignet. In den hier etablierten PCRs wurden acht bis zehn SNPs zusammen amplifiziert. Auch Grignani et al. [2006] verwendeten das SnaPshot-Kit mit acht Primersequenzen. Phillips et al. [2007] setzten in das Kit gleichzeitig 34 Primer ein. Andere amplifizierten 52 SNPs parallel in einer PCR [Sanchez et al. 2006]. Dies erfordert eine sehr genaue Austestung der einzelnen Extensionsprimer. Daher besteht die Möglichkeit, die entwickelten PCRs gegebenenfalls noch um weitere SNPs zu ergänzen. Im Herstellerprotokoll [2000] ist keine Höchstgrenze der Primeranzahl genannt, so dass eher der Platz für deutlich abgrenzbare Signale im Elektropherogramm als limitierender Faktor gelten könnte.

Für die anschließend nötige Aufreinigung der PCR-Produkte, um störende farbmarkierte ddNTPs zu entfernen, wurden in dieser Arbeit zwei Methoden getestet. Verwendet wurde zum einen SAP und zum anderen das Dye Ex Kit. Beide Methoden zeigten gute Ergebnisse und es gab keinen gravierenden Unterschied. Das Dye Ex Kit wird im Labor auch für die Aufreinigung der Sequenzier-Produkte angewandt. Da es aber relativ teuer im Vergleich zu SAP ist, kam in dieser Arbeit SAP für die Aufreinigung zum Einsatz. Der Hersteller des Kits

selbst empfiehlt auch SAP oder CIP (Calf Intestinal Phosphatase) sowie diverse Kits [SNaPshot-Protocol 2000]. Durch die einfachere Handhabung gegenüber den Kits hat sich in der Literatur der Einsatz von SAP ebenfalls durchgesetzt [Lee et al. 2005, Köhnemann et al. 2008].

6.1.1.4 Schwierigkeiten bei der Etablierung der SNP-Analyse

Die meisten Schwierigkeiten ergaben sich bei der Etablierung der PCRs zum Nachweis der H-Unterhaplogruppen. Ursprünglich sollte nur die Amplifikations-PCR in zwei Versionen durchgeführt und die PCR-Produkte zusammen in einer SNaPshot-PCR eingesetzt werden. Damit wären Zeit und Kosten optimiert worden. Obwohl sich die eigentlichen Längen der Extensionsprimer um zwei bis drei Basen unterschieden, wurden in einigen Fällen Signale an fast der gleichen Stelle im analogen Farbbereich amplifiziert. Dies war der Fall bei den Primern für Position 6253, 456 und 8448. Das Problem konnte gelöst werden, indem die zwei PCRs beibehalten und die Primer entsprechend aufgeteilt wurden. Im Herstellerprotokoll [2000] wird ein Abstand von vier Basen zwischen den Extensionsprimerlängen empfohlen. Dieser wurde bei den verwendeten Primern nicht immer realisiert. Durch die elektrophoretische Mobilität ergab sich eine zusätzliche Verstärkung des Problems. Eine weitere Schwierigkeit entstand durch den Ausfall einiger Signale. Aufgrund der Neuordnung der Primer und entsprechender Konzentrationsanpassung waren nach der Etablierung alle SNPs auswertbar. Auffällig waren die anfänglichen Ausfälle der SNPs 3992 und 3936, die zusammen mit dem SNP 3915 in einem Fragment in der Amplifikations-PCR detektiert wurden. Durch die enge Lage auf dem mtDNA-Genom war dies auch sinnvoll. Es zeigte sich jedoch, dass die Extensionsprimer um dieses Fragment scheinbar konkurrierten und so ein stochastisches Problem auftrat. Nach der Trennung der drei Extensionsprimer in zwei Ansätze konnten alle Signale amplifiziert werden. Bei der Etablierung der Methode stellte sich zusätzlich heraus, dass der Primer für den SNP 3915 nicht funktionierte. Beim Einsatz eines neuen Extensionsprimers wurde nicht bedacht, dass dieser -im Gegensatz zum alten Primer- am H-Strang der mtDNA bindet. Folglich amplifizierte dieser auch die komplementären Basen, die anschließend nicht mehr im blau-grünen sondern im rot-schwarzen Farbbereich lagen. Damit detektierte das Signal für 3915 sehr dicht an 4769. Eine Auswertung war dennoch gut möglich, da bei der Auswertung der Haplogruppe nur ein Signal in den roten Farbbereich wechseln konnte. Das Signal für den SNP 14470 war in fast allen Proben signifikant kleiner als die anderen Signale. Dieses Phänomen beschreiben auch Vallone et al. [2004]. Sie designten die Primersequenz neu und setzten bis zu 20 µM in die

PCR ein. Trotzdem blieb das Signal weiterhin um zwei Drittel kleiner im Vergleich zu den anderen Signalen. Erst durch die Erhöhung der Polymerasekonzentration konnte das Signal vergrößert werden. In dieser Arbeit erfolgte keine Erhöhung der Polymerasekonzentration. Das Signal war durch das relativ ruhige Grundrauschen im grünen Farbbereich auswertbar.

Bei der Etablierung der SNP-Analyse zum Nachweis der westeuropäischen Haplogruppen entstanden kaum Schwierigkeiten. Alle Signale konnten von Anfang an detektiert werden. Nur durch die Kürzungen der Extensionsprimer und der elektrophoretischen Mobilität lagen auch hier die Signale für die SNPs 15904 und 12372 sehr eng zusammen. Bei genügend DNA in den Proben waren die Signale deutlich voneinander abgrenzbar. Zusätzlich detektierten beide Signale eine andere Haplogruppe, so dass auch diese nicht zusammen als SNPs auftraten. Nach der Anpassung der Primerkonzentrationen zeigten einige Fragmente stärkere Fluoreszenzsignale als andere, bedingt durch die Zusammensetzung des Minisequencing-Kits. So war die Signalthöhe auch abhängig von der Farbmarkierung des gebundenen ddNTPs. Meist zeigte Guanin, markiert mit dR100, höhere Signale als die anderen ddNTPs [Quintans et al. 2004]. Dies konnte auch bei den in dieser Arbeit etablierten PCRs festgestellt werden (siehe Abbildung 18 und 20).

Die Artefaktbildung wird wahrscheinlich durch den eingesetzten Primer (8697) verursacht. Abhängig von der Menge an eingesetzter DNA schwankt die Größe des Artefaktes. Je mehr DNA desto kleiner ist das Signal. Auch in der Negativkontrolle ist dieses Signal meistens vorhanden. Voraussichtlich könnte durch die Verwendung einer anderen Sequenz für den Extensionsprimer auf dem entgegengesetzten Strang dieses Artefakt entfernt werden.

6.1.1.5 Nachweisgrenzen

In allen drei PCRs konnte eine Nachweisgrenze von 500 fg bei 40 Zyklen erreicht werden. Das ist weniger als eine Zelle, die einen DNA-Gehalt von 6,6 pg aufweist [McConkey 2004]. Durch die hohe Nachweisgrenze eignen sich die PCRs besonders für geringe Mengen oder stark degradierte DNA. Es besteht jedoch durch die hohe Nachweisgrenze auch eine hohe Kontaminationsgefahr. Brandstätter et al. [2003] geben für ihre PCR eine Nachweisgrenze von 1 pg bei 32 Zyklen an. Auch Vallone et al. [2004] erreichen eine Sensitivität von 1-2 pg bei 33 Zyklen. Die 40 Zyklen für diese etablierten PCRs sind auch gewählt worden, um die Ergebnisse besser mit der meist vorgeschalteten Duplex-PCR vergleichen zu können.

6.1.2 Einsatz der SNP-Analyse in der Forensik

Bisher beruhten genetische Analysen vor allem auf den Nachweis von repetitiven Sequenzen (STRs). Auch künftig werden diese weiter bestehen, da sie einen hohen Polymorphiegrad aufweisen. Zusätzlich gründen sich die Datensätze in den Datenbanken (z.B. Interpol, Bundeskriminalamt) auf STR-Analysen. Trotzdem suchen forensische DNA-Spezialisten weitere Marker speziell für degradierte Proben, die zur Identifizierung genutzt werden können [Budowle et al. 2004b, Butler 2005]. Seit einigen Jahren werden verstärkt einzelne Nukleotidunterschiede (SNPs), die häufigste Mutation im menschlichen Genom, untersucht, begründet durch ihre große Anzahl. Auf etwa 1.000 Basen kommt ein SNP, so dass Millionen SNPs pro Individuum existieren [Bernat et al. 2002]. Viele SNPs konnten mit Krankheiten in Zusammenhang gebracht werden [Brookes 1999, Coble et al. 2004]. Andere autosomale SNPs eignen sich gut für Vaterschaften [Ayres 2005, Børsting et al. 2008] oder für die forensische Identifizierung unbekannter Leichen [Sanchez et al. 2006] als auch zur Bestimmung der Herkunft [Phillips et al. 2007]. Phylogenetische Untersuchungen werden überwiegend an SNPs in der mtDNA durchgeführt [Finnilä et al. 2001, Longväli et al. 2004, Richards et al. 2000].

Die in dieser Arbeit etablierten SNP-PCRs sind insbesondere für degradierte Proben oder Proben mit geringem DNA-Gehalt, wie Skelettmaterial oder Haare, geeignet, bei denen STR-Analysen unter Umständen nicht mehr zur Identifizierung führen. Durch die jetzt mögliche, zusätzliche Analyse von Polymorphismen im kodierenden Bereich der mtDNA kann die Diskriminanzkraft der klassischen HVI/HVII-Sequenzen erhöht werden [Brandstätter et al. 2003, Grignani et al. 2006]. Zwei Fälle wurden unter anderem bisher veröffentlicht, in dem die SNP Analyse zusätzliche Ausschlüsse bei einer Identifizierung erbrachte. Die hypervariable Region unterschied sich nur in einer Position. Weil dies für einen Ausschluss nicht ausreicht, kam eine SNP-Analyse zum Einsatz, die einen weiteren Ausschluss erbrachte [Just et al. 2004].

6.1.3 Untersuchung der forensischen Proben

In weiteren Experimenten sollte mit den neu etablierten SNP-PCRs untersucht werden, inwieweit sich diese Methode auch für den Bereich der Spurenanalytik bei Problemspuren gut eignet. Dafür wurden DNA-Proben aus den Jahren 2006 bis 2008 untersucht, die mit einer konventionellen STR-Analyse nur sehr schlechte Ergebnisse aufwiesen.

Die bessere Erfolgsquote der SNP-Analyse der westeuropäischen Haplogruppen gegenüber der STR-Analyse (siehe 5.1.5.2) ist durch die verwendeten kleinen Amplifikationsprodukte erklärbar. Diese liegen bei den untersuchten SNPs etwa zwischen 80 und 180 bp und sind somit wesentlich kleiner als konventionelle STRs [Dixon et al. 2006]. Damit sind die amplifizierten Fragmente in dieser SNP-PCR noch relativ groß. Auch andere Veröffentlichungen nutzten Fragmentgrößen dieser Art für forensische Fragestellungen [Vallone et al. 2004, Köhnemann et al. 2008]. Es existieren jedoch noch kleinere Fragmente für die SNP-Analyse [Asari et al. 2009]. Die von Sanchez et al. [2006] entwickelte autosomale 52 SNP-plex weist Amplikons bis zu 120 bp auf, wobei die meisten unter 100 bp lang sind. Insgesamt reicht die ausgewählte Größe der amplifizierten Fragmente aus, um erfolgreich SNPs aus Proben zu typisieren, die durch eine starke Degradation der DNA gekennzeichnet sind.

Ein weiterer Grund für die guten Ergebnisse der mitochondrialen SNPs ist die (bereits beschriebene), hohe Anzahl an mtDNA-Kopien in der Zelle. Wie die Ergebnisse unter 5.1.5.1 zeigen, konnte auch in Proben, die kein Signal für das 280 bp Fragment in der Screening-PCR amplifizierten, noch vollständige SNP-Profile detektiert werden. Jedoch ist der Prozentsatz deutlich geringer im Vergleich mit den vollständigen SNP-Profilen bei einem Komplettausfall der STR-Systeme. Die geringere Anzahl an Signalen in der Screening-PCR (siehe 4.3.2.2) könnte zum einen an der Größe des mtDNA-Fragments liegen, welches bis zu dreimal so lang gegenüber den untersuchten SNP-Fragmenten ist. Zum anderen läuft die Screening-PCR mit 10 Zyklen weniger als die SNP-PCR und weist dadurch eine geringere Nachweisgrenze auf.

Obwohl bei der Auswahl der Proben darauf geachtet wurde, keine Mischspuren zu untersuchen, konnten Mischprofile festgestellt werden. Jedoch war nur das Spurenmaterial davon betroffen. Dies belegt auch eine Studie, die Mischprofile an verschiedenen Vergleichsmaterialien mittels STR-Analyse nachgewiesen hat [Schwark et al. 2008]. Auch hier gelang der Nachweis von Mischprofilen u.a. an Zahnbürsten und Rasierern. Da die Mischprofile hauptsächlich bei Proben mit sehr stark degradiert DNA nachgewiesen wurden, ergaben die STR-Profile meist einen Komplettausfall der Systeme. Somit war ein Vergleich beider Systeme nicht durchführbar. Der Nachweis von Mischspuren ist nur an mtSNPs möglich, weil diese rein mütterlich vererbt werden und somit nur ein Haplotyp, mit Ausnahme von Heteroplasmien, vorliegt. Durch den doppelten Chromosomensatz und den somit möglichen heterozygoten Ausprägungen der nukleären SNPs kann im Kerngenom keine Mischspur durch eine SNP-Analyse unterschieden werden. Vallone et al. [2004] testeten die Detektion von Mischspuren an ihrer entwickelten mitochondrialen SNP-PCR. Alle

Mischverhältnisse von 90:10 bis 10:90 detektierten das Mischprofil. Durch die unterschiedliche Farbmarkierung der einzelnen Nukleotide und der daraus resultierenden elektrophoretischen Mobilität waren die Mischspuren deutlich sichtbar, da die beiden Signale leicht versetzt dargestellt wurden. Somit sind auch Heteroplasmien leichter erkennbar, als bei einer direkten Sequenzierung, wo die Signale direkt übereinander liegen [Vallone et al. 2004]. Der Vergleich der Haplogruppenverteilung in der untersuchten Stichprobe mit veröffentlichten Populationsdaten [Brandstätter et al. 2003] stimmt am ehesten mit einer skandinavischen Stichprobe überein. Mit dieser sind die Häufigkeitswerte der H-Haplogruppe und der Gruppen I, X, W, V und K kongruent. Abweichungen existieren bei den Häufigkeiten der Haplogruppen J, T und U. Da die untersuchten Proben nicht aufgrund ihrer Herkunft ausgewählt wurden, sind diese Werte nicht repräsentativ.

Insgesamt können mit den etablierten SNP-Multiplex-PCRs die häufigsten, westeuropäischen Haplogruppen analysiert werden. Zusätzlich kann von der Haplogruppe H der Nachweis von 15 Untergruppen erfolgen. Damit ist diese Methode als weitere Option für eine Identifizierung von stark degradierten Proben nutzbar. Dies zeigen auch die Ergebnisse der untersuchten forensischen Proben (siehe 5.1.5.2). So konnte in fast 50 % der untersuchten Proben, die einen Komplettausfall in den STR-Systemen aufwiesen, ein vollständiges SNP-Profil erstellt werden. Trotz der niedrigeren Diskriminanzkraft der mtSNPs gegenüber autosomalen STRs können durch die etablierten SNP-PCRs sichere Ausschlüsse festgestellt und Einschlüsse bestätigt werden und somit zu einem Erkenntnisgewinn führen.

6.2 Dekontamination

Kontaminationen sind die größte Bedrohung bzw. Herausforderung für die Arbeit mit minimalen und stark degradierten Proben. Besonders seit dem routinemäßigen Einsatz der PCR-Technik können Kontaminationen leicht zu falsch-positiven Ergebnissen führen, weil moderne DNA die alte oder degradierte DNA überwiegt [Watt 2005]. Deshalb sollte untersucht werden, welche Methode sich am effektivsten zur Entfernung von Kontaminationen eignet.

6.2.1 Beurteilung der Dekontamination mittels UV-Licht

Insgesamt existieren drei verschiedene Kontaminationsquellen. Die Oberfläche der untersuchten Probe kann während der Ausgrabung bzw. Bergung durch die Finder, durch Polizeibeamte oder durch Archäologen und Museumsmitarbeiter mit moderner DNA

kontaminiert werden. Möglich ist auch eine Kontamination während einer vorangegangenen morphologischen Bearbeitung, ebenso wenn die Proben als Lehrmaterial oder Referenzsammlung eingesetzt wurden [Kemp & Smith 2005, Watt 2005, Gill 2001].

Weitere Kontaminationsquellen sind DNA-haltige Laborarbeitsgeräte einschließlich Verbrauchsmaterialien sowie Kreuzkontaminationen zwischen den Proben. Die vorliegende Arbeit bezieht sich ausschließlich auf die erste Kontaminationsquelle.

Viele Arbeitsgruppen nutzen eine Kombination aus mehreren Dekontaminationstechniken. Daraufhin wurde im ersten Teil des Dekontaminationsversuchs eine mechanische Reinigung und eine Bestrahlung mit UV-Licht ausgetestet. Es wurden Knochen verwendet, die keine endogene DNA mehr enthielten. Diese wurden auf drei verschiedene Arten kontaminiert (siehe 3.2). Die Ergebnisse der Duplex-PCR zeigten, dass die Kontamination durch Handkontakt, in über der Hälfte der Proben, entfernt werden konnte. In den restlichen Proben gelang nur noch der Nachweis von mitochondrialer DNA. Bei den Proben, die mit Speichel und DNA kontaminiert wurden, gelang die Reinigung, laut der Ergebnisse aus der Duplex-PCR, kaum. In der STR-Analyse zeigten sich ähnliche Resultate. Die gereinigten Knochenproben mit Handkontakt wiesen jedoch keine reproduzierbaren STR-Profile mit mehr als drei Systemen auf.

Die schlechte Erfolgsquote ist auf mehrere Ursachen zurückzuführen. Zuerst erfolgte die mechanische Reinigung der Proben mit einer Zahnbürste. Damit sollten anhaftende Bodenbestandteile und somit eventuelle Inhibitoren entfernt werden. Eine Dekontamination mit der Zahnbürste war nicht gegeben, da davon ausgegangen werden musste, dass besonders der Speichel und die DNA-Lösung tiefer in den Knochen eingedrungen waren.

Andere Arbeitsgruppen verwenden ausschließlich eine mechanische Reinigung, bei der die Oberfläche der Proben mittels eines Dremels oder Sandpapier entfernt wird [Keyser-Tracqui et al. 2003, Garcia-Bour et al. 2004, Lalueza-Fox et al. 2001, Bender et al. 2000]. Dies konnte bei den vorliegenden Proben nicht zum Einsatz kommen, da sie zu klein und teilweise zu fragil waren. Außerdem ist es möglich, dass durch die Behandlung des Knochens mit Sandpapier die exogene DNA weiter in den Knochen eindringt [Watt 2005]. Zudem gibt Watt [2005] zu bedenken, dass jeder Knochen Unterschiede in der Größe und Dicke der Kompakta aufweist und unterschiedlich stark kontaminiert sein kann. Damit stellt Watt die Frage, wieviel der Oberfläche einer Probe abgenommen werden muss, um eine Kontamination vollständig und erfolgreich zu entfernen. Bouwman et al. [2006] empfehlen, mehr Oberfläche bei einer starken Kontamination abzunehmen. Es werden in dieser Literaturquelle jedoch keine konkreten Werte genannt. Kemp & Smith [2005] geben an, dass es ihnen nicht

gelingen ist, eine Kontamination mit dieser Technik zu eliminieren. Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit auf eine Wiederholung von mechanischen Dekontaminationsmethoden verzichtet.

Anschließend wurden die kontaminierten Knochen mit Ethanol gespült, kurz getrocknet und für zehn Minuten von jeder Seite mit UV-Licht bestrahlt. Auch die Bestrahlung mit UV-Licht ist weit verbreitet [Lassen et al. 1996, Matheson & Loy 2001]. Durch die Bestrahlung mit Licht der Kategorie UVC bilden sich Quervernetzungen der DNA-Stränge sowie Doppelstrangbrüche, so dass eine PCR-Amplifikation nicht mehr möglich sein sollte. Wie neuere Studien von Hall & Ballantyne [2004] zeigen, muss die Probe aber mehrere Stunden dem UV-Licht ausgesetzt sein, bevor die exogene DNA vollständig fragmentiert vorliegt.

Daher kann die ausgewählte Zeit als zu kurz angesehen werden. Trotzdem zeigte sich bei den Proben mit Hautkontakt ein gewisser Erfolg der Dekontamination gegenüber den nicht gereinigten Knochenproben. Die Signale in der Duplex-PCR waren deutlich kleiner oder fielen vollständig aus im Vergleich zu den nichtgereinigten Proben. Somit war die gesamte Technik bei den Proben mit Hautkontakt teilweise erfolgreich. Gegebenenfalls ist dies jedoch auf die mechanische Reinigung zurückzuführen. Bouwman et al. [2006] dagegen gelang es nicht moderne DNA, die ebenfalls durch Hautkontakt auf die Knochen gelangte, mit fünf Minuten UV-Licht-Behandlung zu entfernen.

Zudem gelang auch bei den Kontrollproben, die nicht gereinigt wurden, sowohl in der Duplex-PCR als auch in der STR-Analyse, nicht immer der Nachweis aller Signale. Die Speichelproben der verschiedenen Probanden können verschiedene Viskositäten und einen unterschiedlichen Gehalt an Mukosazellen aufweisen. Das könnte zu einer ungleichmäßigen Kontamination führen. Die DNA degradiert im Speichel relativ schnell, bedingt durch den Gehalt an Enzymen wie Lysozym, Amylase, Peroxidase und Histadin sowie verschiedenen Bakterien [Dixon et al. 2006]. Es ist davon auszugehen, dass durch den Trocknungsschritt die Enzyme noch besser gewirkt haben.

Ferner gibt es individuelle Unterschiede bei der Kontamination der Knochen durch „Hautkontakt“ (Anfassen). Lowe et al. [2002] konnten nur bei 18 von 30 Personen ein volles STR-Profil an Gefäßen nachweisen, welches die Freiwilligen vorher in der geschlossenen Faust hielten. In der vorliegenden Studie wurden die Proben deshalb von mindestens zwei Personen bewusst in die Hand genommen. Trotzdem gelang nicht immer eine zufriedenstellende Kontamination, jedoch waren die Proben immer stärker kontaminiert als die gereinigten. Die Proben, die mit DNA kontaminiert wurden, zeigten nur in 10 % weniger als drei STR-Signale, unabhängig davon, ob eine Reinigung erfolgte oder nicht. Da die

Proben erst nach der Kontamination pulverisiert wurden, besteht aus statistischer Sicht die Möglichkeit, dass in die Extraktion mehr Material ohne Kontakt zur DNA-Kontamination eingesetzt wurde.

In der STR-Analyse zeigten die gereinigten Proben mit Hautkontakt zwar vereinzelt Signale, aber sie waren nicht reproduzierbar. Zusätzlich konnten typische Zeichen von einer geringen Kopienanzahl an DNA detektiert werden, wie *allel drop out* und *allel drop in*. Dieses Phänomen wird auch für Minimalspuren beschrieben [Kloosterman & Kersbergen 2003].

Diese Studie zeigt, dass geringe Kontaminationen, z.B. Hautkontakt, nicht zu reproduzierbaren Signalen führt, wenn die Knochen (wie unter 3.2 beschrieben) gereinigt werden. Eine falsche Interpretation der Rohdaten kann vermieden werden, wenn die Auswertung, wie in der Literatur beschrieben [Capelli et al. 2003], erfolgt.

Zudem wird davon ausgegangen, dass die angewandte Kontamination mit DNA-Lösung nicht der „Standard“-Situation im archäologischen oder forensischen Kontext entspricht. Speichel oder Schweiß an den Händen dagegen kann auf die Knochenoberfläche übertragen werden. Aufgrund der meist porösen Struktur des Knochens selbst ist es ebenfalls möglich, dass diese Körperflüssigkeiten tiefer in den Knochen eindringen. Auf der anderen Seite zeigen Studien, dass Kontaminationen mit exogener DNA meist erst durch Bearbeiter verursacht werden, die an den Reinigungsschritten und später an den Arbeitsschritten im Labor beteiligt sind [Sampietro et al. 2006]. Da diese genetisch typisiert sein sollten, können die erzielten Profile aus den Knochen mit denen der Bearbeiter abgeglichen und so eine Kontamination aufgedeckt werden.

6.2.2 Beurteilung der Dekontamination mittels Bleiche

Da die Dekontamination mittels UV-Licht zu keinen hundertprozentig zufriedenstellenden Ergebnissen führte, wurde in einem zweiten Versuch eine chemische Reinigung der Knochen mittels Bleiche getestet.

In vielen Veröffentlichungen wird für die Dekontamination handelsübliche Haushaltsbleiche verwendet, die aus 5-6 % Natriumhypochlorit besteht [Andelinovic et al. 2005, Kolman & Tuross 2000, Mulligan 2005]. Bleiche ist ein starkes Oxidationsmittel. Studien von Prütz [1998 und 1996] zeigen, dass sich die Wasserstoffbrücken lösen und die DNA in kleine Fragmente zerfällt. Zudem zerstört die Chemikalie nicht die endogene DNA in den Knochenproben. Laut Kemp & Smith [2005] stützt die Hypothese, dass DNA an das Hydroxylapatit im Knochen bindet und somit gegen äußere Einflüsse besser geschützt ist. Watt [2005] dagegen fand heraus, dass 100 %ige Bleiche nach 24 Stunden die endogene

DNA zerstört. Somit eignet sich Bleiche bei richtiger Behandlung sehr gut für die Dekontamination.

Insofern bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit die Literaturwerte, in denen Bleiche als das optimale Dekontaminationsmittel dargestellt wird. Daraus schlussfolgernd ergibt sich, dass eine vollständige Dekontamination mit handelsüblicher Bleiche (2,8 %) nach zehn Minuten erreicht werden kann. Kemp & Smith [2005] empfehlen 15 Minuten mit 6 %iger Bleiche.

Viele Veröffentlichungen nutzen eine Kombination aus Oberflächenentfernung und/oder chemische Behandlung und/oder Bestrahlung mit UV-Licht [Adachi et al. 2004, Davoren et al. 2007]. Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass allein Bleiche für die Dekontamination ausreicht. Eine Bestrahlung mit UV-Licht ist zu zeitintensiv, als das erfolgreich exogene DNA zerstört wird; und bei der Oberflächenentfernung gibt es keine konkreten Vorgaben, die aussagen, wie viel Knochenmaterial entfernt werden muss. Zudem kann die exogene DNA in den Knochen eindringen. Bleiche, als Flüssigkeit, hat ferner den Vorteil, dass sie jede Unregelmäßigkeit des Knochens erreicht und so gleichmäßig auf der gesamten Oberfläche des Knochens wirkt. Auch entfernt Bleiche spätere PCR-Inhibitoren [Watt 2005]. Ferner ist die Behandlung mit Bleiche kostengünstig und weniger arbeits- und zeitintensiv als andere Dekontaminationsmethoden. Diese Faktoren spielen eine gravierende Rolle bei Massenkatastrophen, bei denen eine schnelle Individualisierung erwünscht und erforderlich ist [Holland et al. 2003].

6.3 Leichenbrand

Trotz der in der Literatur eher negativen Befunde der DNA-Analyse bei Leichenbränden, zeigt diese Arbeit, dass in einigen Fällen erfolgreich DNA nachzuweisen ist. Zusätzlich gelang es in einigen Proben, die Individuen einer Haplogruppe zuzuordnen. Die hier vorgelegten Ergebnisse sollen hinsichtlich ihrer Authentizität im Folgenden einzeln diskutiert werden.

6.3.1 DNA-Qualität und Quantität

6.3.1.1 Modifikation der DNA-Extraktion

Die Wahl der Extraktionsmethode ist entscheidend, um erfolgreich DNA amplifizieren zu können [Hummel 2003]. In der Literatur werden diverse Methoden zur Extraktion von aDNA vorgestellt. Eine favorisierte Methode für alte DNA ist bis dato nicht existent, weil der

individuelle Unterschied der Proben in der aDNA-Forschung zu groß ist. Daher sollte jede Methode an die vorhandenen Proben angepasst werden [Cipollaro et al. 2005]. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Extraktionsmethode für die Leichenbrandanalyse zu optimieren. Zunächst erfolgte die Extraktion der DNA aus den Leichenbränden mit dem Invisorb Forensic Kit. Dieses Kit führte schon in der vorausgegangenen Diplomarbeit zu vielversprechenden Ergebnissen und zeigte auch in dieser Arbeit relativ gute Resultate. Jedoch war es nötig, die Proben anschließend mit einem Aufreinigungs-Kit zu behandeln, um mitextrahierte Inhibitoren zu eliminieren. Auf eine Extraktion mit Phenol-Chloroform wurde bewusst verzichtet. Diese Methode wird in der Literatur [Hummel 2003] besonders empfohlen, wenn nDNA aus historischen Knochen isoliert werden soll. Sie beinhaltet aber den Umgang mit hochgiftigen Substanzen und ist relativ zeitaufwendig.

Durch die Nutzung eines kommerziellen Kits ist eine standardisierte Extraktion möglich. Etwaige individuelle Unterschiede in der Bearbeitung der Knochen können hierdurch minimiert werden. Auf den Einsatz einer modernen Knochenprobe, welche als Extraktionspositivkontrolle fungiert hätte, wurde verzichtet, um Kontaminationen zu vermeiden [Montiel et al. 2001, Poinar 2003].

Vorversuche zeigten, dass die Zugabe von Proteinase K in den Lysisschritt die Hemmung durch Inhibitoren reduzierte. Der Zusatz von Proteinase K, einem starken Denaturierungsreagenz, bewirkt vorrangig den Abbau der Histone [Hummel 2003]. Einen Hinweis auf eine reduzierende Wirkung auf die Inhibitoren konnte aus der Literatur nicht belegt werden.

Während der vorliegenden Arbeit wurde die Extraktionsmethode einmal umgestellt. Vergleichende Studien von Extraktionsmethoden in der Literatur zeigen, dass Silica-basierende Methoden am besten geeignet sind, um aDNA zu extrahieren [Davoren et al. 2007, Handt et al. 1996, Anderung et al. 2008]. Zusätzlich erfolgte eine Dekalzifizierung der Knochen mit EDTA, um eventuell vorhandene Knochenzellen von der Matrix zu lösen [Bender et al. 2000]. Des Weiteren kann Calcium die PCR hemmen und sollte daher entfernt werden [Andelinovic et al. 2005]. Als Grundlage für das angewandte Dekalzifizierungsprotokoll diente die Veröffentlichung von Andelinovic et al. [2005]. In dieser Literaturquelle wurde das EDTA täglich gewechselt und insgesamt drei bis fünf Tage angewendet. In den Publikationen schwanken die Inkubationstemperaturen von 4 °C [Kolman & Tuross 2000] über Raumtemperatur [Andelinovic et al. 2005] und 37 °C [Fondevila et al. 2008] bis hin zu 55 °C [Anleitung Nr. 17 QuickGene von Fujifilm]. In der vorliegenden Arbeit wurde der EDTA-Schritt bei 56 °C zunächst für einen Tag ausprobiert. Die Ergebnisse

bewiesen eine deutlich geringere Inhibition der Proben (siehe Tab. 32). Um den Erfolg der Dekalzifizierung, sichtbar an der feineren Knochenpulverschicht auf dem restlichen Knochenpulver nach Zentrifugation, zu erhöhen, wurde dieser Schritt auf drei Tage ausgedehnt. Kolman & Tuross [2000] konnten aufzeigen, dass eine längere Dekalzifizierung stärkere aDNA-Signale erzeugt und Kontaminationssignale (wenn vorhanden) schwächer werden. Die drei Tage Dekalzifizierungszeit wurden ebenfalls aus dem Protokoll Nr. 17 [QuickGene von Fujifilm] entnommen. Da für dieses Protokoll ein spezielles Extraktionsgerät erforderlich ist, wurde das Invisorb Spin Forensic Kit eingesetzt. Dieses ist von der verwendeten Methode dem Kit von QuickGene sehr ähnlich und erfordert keine zusätzlichen Geräte. Der Dekalzifizierungsschritt wurde weiterhin genutzt.

EDTA entfernt nicht nur Calcium, welches die PCR inhibieren könnte, sondern auch Eisensalze [Gilbert et al. 2005]. Da die Leichenbrandproben aus der vorrömischen Eisenzeit und der römischen Kaiserzeit stammten und häufig eisenhaltige Beigaben enthielten, erklärt dies den geringen Prozentsatz an inhibierten Proben, nachdem diese Methode angewandt wurde. Auch Hagelberg & Clegg [1991] sowie Kolman & Tuross [2000] konnten feststellen, dass durch die Waschungen mit EDTA die dunklen Überstände immer heller und das Huminsäuren und Eisensalze aus den Proben entfernt wurden. Auch anhand dieser Ergebnisse dehnte sich der Dekalzifizierungsschritt von einen Tag auf drei Tage aus, begründet ebenfalls durch das Hellerwerden der Überstände bei den Leichenbrandproben.

Infolge der verbesserten Extraktionsmethode konnte auf eine anschließende Aufreinigung der DNA mit einem kommerziellen Kit verzichtet werden. Zudem ist bei jedem Aufreinigungsschritt vom Verlust an DNA auszugehen [Hummel 2003]. Ohne die zusätzliche Aufreinigung ist auch die Gefahr einer Kontamination geringer, da weniger Arbeitsschritte notwendig sind [Loreille et al. 2007].

6.3.1.2 Nachweis von DNA und Inhibitoren

Wenn authentische DNA in den Leichenbränden vermutet werden kann, ist davon auszugehen, dass diese sehr degradiert vorliegt. Daher ist es sinnvoll, die DNA-Qualität vor einer Typisierung zu überprüfen. Aus diesem Grund wurden alle Leichenbrandproben zunächst in die Duplex-PCR (siehe 4.3.2.1) eingesetzt, die sich als sehr geeignete Methode bei der Analyse von hoch degradierten DNA-Proben erwiesen hat [von Wurmb-Schwark et al. 2004].

Bei der Auswertung der Ergebnisse nach der Kapillarelektrophorese im Abi Prism 310 konnte in 13,2 % der Proben aller Gräberfelder DNA nachgewiesen werden (siehe Tabelle 33).

Eine Reproduktion der Ergebnisse durch eine erneute Extraktion der positiven DNA-Proben gelang nur in 17 Proben. Dabei konnten nur Signale für mtDNA erfolgreich reproduziert werden. Dies deutet auf eine sehr starke Degradation der nukleären DNA hin, so dass deren Fragmente eine Länge von 164 bp nicht überschreiten dürften. Das wird auch in der Screening-PCR, in der die meisten Proben eingesetzt wurden, um PCR-Inhibitoren nachzuweisen, bestätigt. In keiner Probe konnte mit Hilfe der Screening-PCR nukleäre oder mitochondriale DNA nachgewiesen werden. Ein Grund dafür ist auch in der geringen Zyklenzahl der Screening-PCR und der damit niedrigeren Nachweisgrenze zu sehen.

Der Ausfall beider Signale in der Duplex-PCR kann sich auf mehrere Ursachen gründen. Zum einen könnte die DNA-Menge in der Probe zu gering (unter 10 pg) sein, um detektiert zu werden. Zum anderen könnte die Konzentration der Inhibitoren zu hoch liegen. Um dies auszuschließen, wurde jede Probe entweder in die Screening-PCR oder in die Inhibitor-Duplex-PCR eingesetzt. Des Weiteren sind durch die starke Degradation der DNA nur noch sehr kleine Fragmente bis 100 bp Länge in der Probe zu vermuten, so dass diese ebenfalls nicht mit der verwendeten Duplex-PCR detektiert werden können [von Wurmb-Schwark et al. 2004].

Ein weiterer Grund für die relativ schlechten Reproduktionsergebnisse ist in der geringen Menge an DNA in der Probe zu suchen. Sind nur wenige Zellen existent, ist es wahrscheinlich, dass diese im Knochenpulver bei einer nochmaligen Extraktion nicht mehr nachweisbar sind. Daraus ergibt sich ein stochastisches Problem. Auch Burger et al. [1999] zeigen drei mögliche Resultate bei der Untersuchung von aDNA auf. Darunter auch das Ergebnis, dass DNA sporadisch vorhanden aber nicht reproduzierbar ist.

Die geringe Probenanzahl mit positivem DNA-Befund beweist, wie wichtig Mehrfachbeprobungen der einzelnen Urnen sind. Zehn bis 15 Knochen pro Individuum (Leichenbrand) reichen aus, um Aussagen über die DNA-Menge in den Proben zu ermöglichen. Gleichzeitig kann durch die Untersuchung mehrerer Urnen pro Gräberfeld in Bezug auf die Inhibitoren festgestellt werden, ob dieses Gräberfeld für weitere DNA-Analysen in Betracht gezogen werden sollte.

Bei der Auswertung der DNA-haltigen Proben bezogen auf die Gräberfelder fiel auf, dass das Gräberfeld Norderbrarup für weitere Analysen nur bedingt geeignet war. Lediglich drei von 47 Proben zeigten DNA mit der neuen Extraktionsmethode, davon war nur die DNA in einer Probe reproduzierbar. Mit der alten Extraktionsmethode ohne EDTA gelang der Nachweis von DNA niemals. Da aus diesem Gräberfeld jedoch nur sehr wenige Proben und Urnen untersucht wurden, wäre eine nochmalige Beprobung zu empfehlen und sinnvoll. Durch die

Dekalzifizierung und die Silica-basierende Extraktionsmethode war eine DNA-Gewinnung aus diesen Proben generell möglich. Diese Ergebnisse sind durch eine nochmalige Beprobung eventuell zu verifizieren. Auch der Anteil an Proben, die eine PCR-Reaktion hemmen, konnte durch den Einsatz von EDTA gesenkt werden.

Ähnliches gilt auch für das Gräberfeld Sörup II. Hier war die DNA-Ausbeute mit beiden Extraktionsmethoden sehr gering (4,2 %) und nur in einer Probe reproduzierbar. Auch die Inhibition der Proben konnte trotz EDTA-Behandlung nur leicht vermindert werden. Somit ist dieses Gräberfeld nicht für weitere DNA-Analysen geeignet.

Die anderen drei Gräberfelder waren durch eine höhere DNA-Ausbeute gekennzeichnet, die zum Teil auch reproduziert werden konnten. Durch den Einsatz von EDTA war auch hier der Anteil an gehemmten Proben stark gesunken. Der Anteil mit Inhibitoren in den Proben aus Scharbeutz betrug nur 11,6 %. Infolge der Anwendung von nur einer Methode für die Extraktion kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob dieses Gräberfeld generell weniger von Inhibitoren durchsetzt war oder ob es am Erfolg der Methode lag.

Die Ergebnisse zum Nachweis einer Inhibition der Proben stehen im Einklang mit dem Nachweis von DNA. Wenn DNA amplifiziert werden kann, findet keine Hemmung der Proben durch unbekannte Substanzen statt. Es ist aber anzunehmen, dass zum einen eventuell Metalle (z.B. Verschlüsse an der Kleidung, die mit verbrannt wurden) und zum anderen organische Stoffe aus dem Gräberfeld, selbst wie Huminsäuren, die PCR hemmen. Wahrscheinlich deuten die rötlichen Überstände auf das Vorhandensein von Eisenionen hin. Auf den Knochen selbst konnten zum Teil rötliche Antragungen gefunden werden, die Rost vermuten lassen. Grünliche Überstände könnten auf das Vorhandensein von Bronze im Leichenbrand hindeuten. In der Literatur wird zusätzlich davon gesprochen, dass türkisblaue Farbpunkte auf der Oberfläche der Knochen durch die Reaktion des Minerals mit Mangan zu Manganapatit entstehen [Herrmann 1992]. Solche Farbpunkte waren auf dem untersuchten Leichenbrand nicht sichtbar.

Eine direkte Voraussage zur Existenz von Inhibitoren anhand der Farbe des Überstandes kann nicht gegeben werden. Es lässt sich aber als Tendenz erkennen, dass Proben mit helleren und farblosen Überständen weniger in der PCR gehemmt werden.

6.3.2 SNP-Analyse

Um zu überprüfen, ob die nachgewiesene DNA auf Kontaminationen zurückzuführen ist, wurden die Proben einer SNP-Analyse unterzogen.

Generell waren die Ergebnisse der SNP-Analyse der eingesetzten Proben zufriedenstellend. Allerdings muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass die mitgeführten PCR-Negativkontrollen in einigen Durchläufen einige positive Signale aufwiesen. Wenn mehr als vier der SNPs Signale zeigten, wurde die PCR wiederholt und die ersten Ergebnisse nicht mit berücksichtigt. Da die SNP-PCR sehr sensitiv ist, ist sie besonders für Kontaminationen anfällig.

Von den insgesamt 40 Urnen konnten DNA-haltige Proben aus 25 Urnen in die SNP-Analyse eingesetzt werden. Von diesen zeigten Proben aus 14 verschiedenen Urnen keine widersprüchlichen Ergebnisse. Das heißt, wenn mehrere Knochen pro Urne positive DNA-Befunde aufwiesen, stimmten diese miteinander überein. Aus den restlichen DNA-haltigen Proben konnten ebenfalls Signale amplifiziert werden, die jedoch nicht immer mit den anderen Befunden äquivalent waren. Deshalb sollen sie an dieser Stelle diskutiert werden.

Anhand der Duplex-Ergebnisse konnte aufgezeigt werden, dass besonders die DNA aus Leichenbrand, wenn noch vorhanden, stark degradiert vorlag, da überwiegend mtDNA amplifiziert wurde. Diese Degradationserscheinungen werden durch Oxidation und Hydrolyse ausgelöst und führen zu verschiedenen Modifikationen in der DNA. Dabei können, z.B. durch die Spaltung der N-glykosidischen Bindungen und Deaminierungen, falsche Basen in das vorhandene DNA-Fragment eingebaut werden [Hofreiter et al. 2001, Pääbo et al. 2004]. Diese Phänomene können so zu falsch-positiven Ergebnissen führen, da die Deaminierung direkt auf die Sequenz wirkt [Höss et al. 1996]. Besonders die Transition von Cytosin zu Thymin ist wahrscheinlicher als eine Transition von Adenin zu Guanin [Binladen et al. 2006]. Dieser Falscheinbau der Basen kann auch während der PCR auftreten, wenn die Polymerase eine Base falsch bindet [Pääbo et al. 2004]. Bei den untersuchten Leichenbränden ist dies bei der Probe 69/2 der Urne 156a aus Süderbrarup zu vermuten. Allerdings kann durch die schlechte Qualität des Signals auch ein Ablesefehler die Ursache für diese Unstimmigkeit sein. Die Proben (u.a. 66/4, 75/4, 89/10) zeigen jeweils in einem SNP eine Abweichung zu den anderen Proben aus der gleichen Urne. Die Ursache ist ebenfalls in einem Basenfalscheinbau zu suchen. Da nicht jede Probe mehrfach in der SNP-Analyse wiederholt wurde bzw. dieses Signale nicht erneut amplifiziert werden konnten, wie z.B. Probe 66/4, ist dazu keine eindeutige Aussage zu treffen. Eine andere nicht auszuschließende Möglichkeit ist, dass die

Knochen aus einer vorangegangenen Verbrennung stammten und von den damals lebenden Menschen in die falsche Urne verbracht worden sind.

Bei einigen Proben (46/5n, 58/1n, 94/9, 100/2 und 101/6) konnten Mischprofile nachgewiesen werden. Diese beruhen wahrscheinlich auf moderne Kontaminationen. Die Herkunft der Kontaminationen konnte nicht aufgeklärt werden.

Bei der Auswertung der einzelnen Profile wird häufig das Signal für SNP 3010 nicht dargestellt. Auch das Signal für SNP 7028 kann häufig nur bei den Proben amplifiziert werden, bei denen auch sonst die Signale der anderen SNPs detektiert wurden. Diese beiden SNPs besitzen das größte Fragment in der Amplifikations-PCR. Daher legen diese Ergebnisse den Schluss nahe, dass die Zielfragmente durch Strangbrüche zerstört sind und die DNA nur noch in sehr kleinen Fragmenten unter 100 bp vorliegt. Das Signal für SNP 12372 fiel ebenfalls häufig aus. Durch die enge Lage der beiden Signale für Position 12372 und 15904 im blauen Farbbereich, ist eine Auswertung mitunter schwierig, wenn die Signale sehr klein sind. Daher müsste einer der beiden Extensionsprimer in seiner Länge modifiziert werden oder die Proben müssten in einer Singleplex mit 12372 wiederholt laufen, um eine eindeutige Zuordnung der Signale zu ermöglichen.

Die Zuordnung der Haplogruppe bei einigen Proben zeigt, dass von einer Kontamination seitens nur eines Bearbeiters abgesehen werden kann. Im Labor erfolgten alle Arbeitsschritte von der Reinigung der Knochen bis zur Analyse durch einen Mitarbeiter. Eine direkte Kontamination aller Proben kann ausgeschlossen werden, da sich die meisten Proben in den SNP-Signalen von denen des Bearbeiters unterschieden. Bei den Mischprofilen könnte der Bearbeiter als Kontaminationsquelle in Frage kommen.

Besondere Probleme bereiteten die Proben aus Urne 269 aus Scharbeutz. Die fünf untersuchten Proben wiesen drei unterschiedliche Haplotypen auf. Da die Urne vor der Entnahme noch verschlossen war, kommt eine Kontamination aufgrund früherer Bearbeiter nicht in Betracht. Eine direkte Kontamination im Labor durch den Bearbeiter kann nur bei den Proben 97/2 und 97/5 angenommen werden, da sich die anderen Proben in den SNPs unterschieden. Zudem wurden die Proben nicht alle zusammen extrahiert. Warum sich diese so voneinander unterschieden, kann nicht eindeutig gesagt werden. Nach einer erneuten Extraktion zweier Proben war keine DNA mehr amplifizierbar. Falls es sich nicht um eine Kontamination handeln sollte, kann am ehesten ein Basenfalscheinbau in der PCR angenommen werden.

6.3.3 Verbrennungskonditionen

Ein Grund für die Unterschiede in der DNA-Ausbeute zwischen den Gräberfeldern könnte die (unter 1.2 beschriebene) Verbrennungsdauer in den verschiedenen Zeitepochen sein.

Da sich die Verbrennungsdauer und –intensität anhand des Zustandes der Knochenfragmente morphologisch einschätzen lässt, wurden alle Knochenverfärbungen subjektiv bewertet (siehe Tab. 35). Daraus war erkennbar, dass die Knochen aus Süderbrarup, Sörup II und Norderbrarup einen sehr hohen Anteil (82-89 %) an vollständig verbrannten Knochen aufwiesen. Die Knochen aus Gremersdorf und Scharbeutz zeigten einen viel geringeren Anteil (40-50 %) an vollständig verbrannten Knochen, was auf eine hohe Verbrennungstemperatur und lange Verbrennungsdauer schließen lässt.

Die Betrachtung dieser Werte im Zusammenhang mit der Zeit der Belegung der Nekropolen bestätigt die Einschätzung der Archäologen, dass in der vorrömischen Eisenzeit schlechter verbrannt worden ist, als in der römischen Kaiserzeit. Dies könnte auch die relativ guten DNA-Ergebnisse in Gremersdorf und Scharbeutz erklären. Ebenso stützt der Vergleich der Knochenfärbung mit einem positiven DNA-Ergebnis diese These. So findet sich DNA hauptsächlich in Knochen, die weiß-grau-schwarz verfärbt sind, gefolgt von Knochen, die weiß-schwarz oder schwarz verfärbt sind. Nur in 6,3 % der Knochen mit einer rein weißen Verfärbung konnte DNA nachgewiesen werden. Dies spricht für eine hohe Verbrennungstemperatur, aber unter Umständen einer geringeren Verbrennungsdauer. Kurzfristige Hitzeeinwirkungen sind nicht maßgeblich für die Verbrennung von Knochen verantwortlich, sondern eine hohe Verbrennungstemperatur über einen langen Zeitraum. Daher ist es auch möglich, DNA-Analysen an Brandopfern, die bei hohen Temperaturen ums Leben gekommen sind, erfolgreich durchführen zu können (siehe Kapitel 5.4).

Anhand von Experimenten, die eine Leichenverbrennung auf einem Scheiterhaufen rekonstruierten, konnte gezeigt werden, dass hohe Temperaturen (um die 1000 °C) über eine längere Zeit gehalten werden konnten. Trotzdem verbrannten die eingesetzten Schweinekadaver nur unvollständig. Dies wird erklärt, indem die Weichteile eine schlecht wärmeleitende Kruste bilden und die darunter liegenden Körperschichten eine Zeit lang schützen. Die unvollständig verbrannten Gewebereste bleiben im archäologischen Kontext nicht erhalten. Jedoch sind auf den unvollständig kalzinierten Knochen Partien organischer Reste vorhanden [Becker et al. 2005]. Beim Abbau dieser Gewebereste könnte die DNA in den Knochen eindringen und sich dort an das Hydroxylapatit binden und so erhalten bleiben. Besonders Wirbelkörper liegen nach der Verbrennung noch im anatomischen Verbund vor. Das anliegende Gewebe von schwarz verfärbten Knochen (Verbrennung um 400 °C) war im

Experiment lediglich hitzefixiert. Diese Knochen mit Geweberesten wurden wahrscheinlich mit in den Urnen bestattet. Solche Knochen sind für die kaiserzeitlichen Gräberfelder Loitsche und Zethlingen belegt, obwohl der Rest des Leichenbrandes sehr gut verbrannt war [Becker et al. 2005].

Wenn sich diese Ergebnisse auf die untersuchten Gräberfelder übertragen lassen, ist der relativ gute DNA-Gehalt in den Knochen ebenfalls erklärbar.

6.3.4 Möglichkeit des Erhalts von DNA in Leichenbränden

Insgesamt konnte in dieser Arbeit in 68 Proben (13,2 %) meist mtDNA nachgewiesen werden, die in 25 % der DNA-haltigen Proben reproduziert wurde. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Überlegungen von Grosskopf [unpubliziert], die DNA-Analysen an Leichenbränden nicht für möglich hält. Andererseits ist es Cattaneo et al. [1999] gelungen, Albumin in verbrannten Knochen nachzuweisen, sodass damit zu rechnen ist, dass auch andere Biomoleküle überdauern können. Der Nachweis mitochondrialer DNA gelang an den verbrannten Knochen nicht. Allerdings verwendeten sie keinen Leichenbrand, sondern frische Knochen, die ohne Gewebe in kleinen Stücken für 20 Minuten einer Temperatur von 800-1000 °C ausgesetzt waren. Damit sind diese Knochen ohne den Schutz des Weichgewebes wahrscheinlich viel stärker verbrannt als vergleichbarer Leichenbrand. Brown et al. [1995] gelang der Nachweis von humaner DNA aus einer bronzezeitlichen Verbrennung. Auch Pusch et al. [2000] amplifizierten DNA aus Tierknochen, die häufig als Beigabe in einer Urne zu finden sind. Menschliche DNA aus Leichenbränden detektierte die Arbeitsgruppe nicht.

Während der Verbrennung der Knochen werden die organischen Bestandteile in anorganische umgewandelt und es entstehen Calciumphosphatverbindungen, welche sich stabilisierend auf die noch vorhandenen Nukleinsäuren auswirken [Hummel et al. 2001, Burger et al. 1999]. Durch die vermutlich zeitnahe Verbrennung der Toten und durch die Trockenheit der Knochen nach der Verbrennung wurden auch hydrolytische und oxidative Schädigungen, der noch eventuell verbliebenen Rest-DNA, reduziert. Zwar waren die bestatteten Urnen im Erdreich der Witterung ausgesetzt, doch dies betrifft auch die Körpergräber, aus denen noch erfolgreich DNA amplifiziert werden konnte [Beauval et al. 2005, Cappellini et al. 2004, Hummel et al. 1999]. Wenn noch DNA nach der Verbrennung in den Knochen vorhanden ist, müsste diese unter Umständen auch die Zeit im Erdboden überstehen können.

6.3.5 Echtheit der Ergebnisse

Aufgrund der schwierigen Analyse von authentischer DNA wurden verschiedene Echtheitskriterien für gewonnene Ergebnisse veröffentlicht [Hofreiter et al. 2001, Pääbo et al. 2004, Poinar 2003]. Diese sollen mit den gewonnenen Ergebnissen abgeglichen werden.

Die Räume für die Extraktion, die PCR-Ansätze und die Post-PCR-Bereiche sind in verschiedenen Teilen des Gebäudes untergebracht. Eine Trennung der Arbeitsplätze von moderner DNA und Leichenbrandanalysen war gegeben. Allerdings erfolgte die Bearbeitung der Leichenbrandproben im gleichen Raum wie die Bearbeitung der modernen DNA-Proben, jedoch nicht zur gleichen Zeit, sodass ein direkter Kontakt mit moderner DNA ausgeschlossen werden konnte. Ein getrennter Pipettensatz, eigene Reagenzien und Reaktionsgefäße usw. standen ebenfalls zur Verfügung. Zudem kamen nur gestopfte Pipettenspitzen zum Einsatz, um eine Kontamination der Pipetten und Reagenzien zu vermeiden. Soweit möglich, erfolgte eine Aliquotierung aller eingesetzten Reagenzien. Während der Extraktion wurde ein Mundschutz getragen und die Handschuhe regelmäßig gewechselt.

Negativkontrollen wurden bei allen Schritten der Extraktion als auch der PCR mitgeführt. Wenn die Kontrollen Signale zeigten, wurden die Ergebnisse nicht berücksichtigt und die Analyse wiederholt. DNA-Nachweis aus Negativkontrollen können auch auf sporadische Kontaminationen der Reaktionsgefäße hindeuten, sodass die Proben nicht unbedingt kontaminiert sein müssen [Gill & Kirkham 2004]. Der Einsatz von Positivkontrollen erfolgte nur bei der PCR mit verdünnter DNA-Lösung eines Mitarbeiters, dessen Profil bekannt war und das mit den Ergebnissen abgeglichen wurde. Zudem wurde die Positivkontrolle als letztes pipettiert, wenn alle anderen Gefäße bereits verschlossen waren.

Die Primer waren an das stark degradierte Material angepasst. Besonders die amplifizierten Fragmente der SNP-Analyse lagen unter 200 bp. Es wird davon ausgegangen, dass DNA-Fragmente über 200 bp aus aDNA-Proben durch den hohen Degradationsgrad nicht mehr amplifiziert werden können.

Eine Reproduktion durch eine erneute Extraktion erfolgte an den Proben, von denen noch genügend Knochenmaterial zur Verfügung stand. Eine erneute erfolgreiche Amplifikation gelang nur in 25 % der Proben, die sich schon vorher durch positive Signale auszeichneten. Durch die SNP-Analyse kann gezeigt werden, dass in 14 Urnen die Ergebnisse der unterschiedlichen Proben übereinstimmen. Ein weiteres Indiz, dass keine Kontamination im Labor stattgefunden hat, ist bei den Proben aus zwei Urnen aus Süderbrarup erkennbar. Die Urnen wurden zweimal beprobt und beide Beprobungen zeigten Knochen mit positiven DNA-

Ergebnissen. Zusätzlich gelang der Nachweis von SNPs, die in beiden Probensätzen identisch waren. Somit kann für diese Proben eine Kontamination im Labor weitestgehend ausgeschlossen werden, da zwischen den Untersuchungen ein Zeitraum von mehr als einem Jahr lag. Folglich wurden die Knochen mit anderen Extraktionskitschargen und PCR-Reagenzien analysiert. Da die Urnen bereits geöffnet waren, könnte auch ein Mitarbeiter aus früheren Untersuchungen für eine eventuelle Kontamination verantwortlich sein. Die Urnen aus Gremersdorf, die schon während der Diplomarbeit analysiert wurden, enthielten ebenfalls wieder Knochen, aus denen DNA isoliert werden konnte. Jedoch ist in den neu isolierten Knochen nur noch mtDNA nachweisbar. Weil die Knochen im Magazin des Landesmuseums nicht gekühlt gelagert wurden, könnte dies die stärkere Degradation und die geringere Menge an DNA, im Vergleich zur Diplomarbeit, erklären.

Da in dieser Arbeit aufgrund der Degradation nur die SNP-Analyse für eine Kontaminationsaufdeckung genutzt werden konnte, sind die Proben, welche Unstimmigkeiten aufwiesen, besonders kritisch zu betrachten. Auch wenn diese, zum Teil durch Basenfalscheinbau und eventueller Einbringung von einzelnen Knochen aus anderen Bestattungen in die Urnen, zu erklären wären, können auch Kontaminationen als Ursache nicht ausgeschlossen werden. Besonders die Proben der Urne 269 aus Scharbeutz zeigten drei verschiedene SNP-Profile, die nicht eindeutig erklärbar sind. Wenn es sich um Kontaminationen handeln sollte, könnten diese nur im Labor oder direkt beim Ausnehmen der Urne entstanden sein, denn diese wurde bei der Beprobung erst geöffnet. Andererseits ist eine Kontamination im Labor durch drei verschiedene Personen eher unwahrscheinlich.

6.4 Mögliche Identifizierung von Brandleichen in Abhängigkeit zum Verbrennungsgrad

Ziel der Arbeit war die molekulargenetische Untersuchung der Brandleichen im Hinblick auf eine DNA-Erhaltung in verbrannten Knochen. Es sollte herausgefunden werden, bis zu welchem Verbrennungsgrad authentische DNA in den Knochen nachweisbar ist.

6.4.1 Auswahl der untersuchten Proben

Die 13 untersuchten Brandleichen wiesen alle eine so starke Brandzehrung auf, dass vereinzelte oder viele Knochen nicht mehr von Weichgewebe umgeben und die Knochen direkt dem Feuer ausgesetzt waren. Damit konnte eine entsprechende Degradation der DNA

in den Knochen vorausgesetzt werden. Durch die geringe Anzahl an Brandleichen, die dieses Kriterium erfüllten, wurde auf eine Unterteilung nach dem Ort der Verbrennung und einer dadurch erreichten, möglichen Temperatur verzichtet. In der Literatur wird angenommen, dass z.B. bei Fahrzeugbränden Temperaturen von über 1000 °C erreicht werden können, begründet durch die Treibstoffzufuhr [Bohnert 2007].

Zunächst wurden die untersuchten 71 Knochen subjektiv in fünf Verbrennungsgrade unterteilt. Eine Bevorzugung von Kompakta gegenüber Spongiosa erfolgte nicht. Dabei fiel auf, dass an einem Individuum unterschiedliche Verbrennungsstufen der Knochen auftreten können. Dies lässt sich mit einer ungleichmäßigen Verbrennung erklären. Die Befunde werden durch die Höhe der Temperatur, die Einwirkdauer und die Art der Wärmeübertragung beeinflusst [Bohnert 2007]. Auch die Lage einer Person spielt bei der Verbrennung eine signifikante Rolle. So kann die Haut, und somit auch das darunter liegende Gewebe, an den Kontaktflächen, z.B. zum Boden oder Autositz, kaum verbrannt sein und der Rest der Haut ist verkohlt [DiMaio & DiMaio 1993]. Ebenso einen Einfluss auf die Verbrennung hat die Kleidung. Bekleidete Körperteile, besonders mit eng anliegende Sachen, sind besser geschützt als unbedeckte Stellen am Körper [Bohnert 2007].

Bei einer starken Brandeinwirkung ist meist zuerst das Weichgewebe des Gesichtes vollständig verbrannt und der Schädel liegt frei. Auch die Extremitäten sind besonders stark betroffen; Hände und Füße sind bei vielen Brandleichen nicht mehr vorhanden [DiMaio & DiMaio 1993]. Diese Knochen sind durch ihre geringe Gewebetiefe schneller der Verbrennung ausgesetzt und kaum geschützt [Symes et al. 2008]. Auch in der vorliegenden Studie können diese Befunde bestätigt werden (siehe Tab. 4). So sind z.B. im Fall zwölf die Totenflecken noch sichtbar, aber die Finger waren schon soweit verbrannt, dass die Fingerknochen schwarz verkohlt waren.

6.4.2 Zustand der DNA-Qualität und -Quantität nach der Verbrennung

Um einen ersten Überblick über die Qualität und Quantität der extrahierten DNA aus den einzelnen Gruppen zu erhalten, kamen die Duplex-PCR und die Screening-PCR zum Einsatz. Die Ergebnisse beider PCRs zeigten einen erwarteten Abfall der Signale bei Zunahme des Verbrennungsgrades. In der Duplex-PCR sind die mitochondrialen Signale in den Gruppen I (kaum verbrannt) und II (halb verbrannt) etwas kleiner als die nukleären Signale. Zum einen kann das durch die geringeren Primerkonzentration bewirkt werden. Diese ist nur halb so hoch wie die Konzentration der Primer für das nukleäre Fragment. Zum anderen sind bei der Auswertung der Elektropherogramme die Signale teilweise abgebrochen, weil die Software

diese sonst nicht mehr darstellen kann. Somit sind auch die Flächen kleiner. Ab dem Verbrennungsgrad schwarz verbrannt zeigen sich die Signale für mtDNA größer als bei nDNA. Der Grund ist die eingesetzte, starke Degradation der DNA. Da mehr Kopien für die mtDNA in der Zelle vorliegen, ist die Wahrscheinlichkeit, diese noch besser nachweisen zu können, größer [Bär et al. 2000]. Der DNA-Gehalt in den Gruppen IV (blau-grau verbrannt) und V (blau-grau-weiß verbrannt) ist sehr gering. Nur zwei von acht untersuchten Proben zeigten DNA-Signale in den beiden untersuchten DNA-Fragmenten. Beide Proben stammten vom gleichen Individuum. Diese schlechten Ergebnisse für die Gruppe V sind auch von Bohnert & Rothschild [2003] in einer anderen Studie beschrieben worden. Dabei handelte es sich um einen kombinierten Suizid, bei dem sich der Mann selbst in den Kopf schoss und dann anzündete. Hier wurde der Körper extrem durch das Feuer zerstört, so dass die Knochen wahrscheinlich dem Verbrennungsgrad der Gruppe V dieser Studie zuzuordnen. Auch in der Studie von Bohnert & Rothschild [2003] gelang es nicht aus diesen Knochen DNA zu amplifizieren, was die Befunde aus der vorliegenden Studie bestätigt.

Zusätzlich wurden alle Proben in die Screening-PCR eingesetzt. Auch hier ergab sich das erwartete Bild vom Abfall bzw. Ausfall der Signale bei Zunahme des Verbrennungsgrades. In der Gruppe I (kaum verbrannt) konnten alle nukleären Signale zu 100 % in den Proben detektiert werden. Die mitochondrialen Signale dagegen fielen in einigen Proben aus. Als Grund könnte die große Menge an eingesetzter DNA angenommen werden. Hierdurch ist die Polymerase infolge des Überangebotes überlastet [Butler 2005]. Nach einer erneuten Analyse der Proben mit weniger DNA konnte auch in diesen Proben mtDNA erfolgreich amplifiziert werden. Zudem stellten die Ergebnisse aus der Duplex-PCR und aus der Sequenzierung bei diesen Proben gute Werte für die mtDNA dar, womit die Theorie der überladenen Polymerase gestützt werden kann. In der Gruppe III zeigte sich ein sehr heterogenes Bild. Dabei konnte besonders der Nachweis von Amelogenin als auch der Nachweis des kleineren mtDNA-Fragments in ca. der Hälfte der Proben noch erbracht werden. Auch dies deutet auf eine starke DNA-Degradation der Proben hin, da nur noch kleine Fragmente der DNA erfolgreich amplifiziert werden können. Ebenso setzte sich dieser Trend in den Proben aus Gruppe IV und V fort. Obwohl die Screening-PCR durch den Einsatz von Mini-STRs besonders geeignet ist, degradierte DNA nachzuweisen, kommt es in den höheren Verbrennungsgraden verstärkt zu Ausfällen. Jedoch konnte Amelogenin durch seine kurze Länge von 74 bzw. 77 bp noch erfolgreich in 25 % der Proben aus Gruppe V nachgewiesen werden. Auch das Signal für das 280 bp lange mitochondriale DNA-Fragment war erwartungsgemäß häufiger detektierbar als das 439 bp lange Fragment und einige nukleäre Marker. Das ist typisch für stark degradierte

DNA, weil die mitochondriale DNA in einer größeren Kopienanzahl vorliegt. Eine Studie an künstlich degradiertem DNA zeigt, dass mtDNA-Fragmente über 400 bp nicht mehr zu amplifizieren sind. DNA-Stücke bis zu einer Länge von 220 bp, in Ausnahmefällen auch 300 bp können dagegen noch detektiert werden [Bender et al. 2004]. Auch in dieser Studie gelang der Nachweis des 439 bp langen mtDNA-Fragments in der am stärksten verbrannten Gruppe nicht mehr. Nukleäre Fragmente unter 220 bp und das 280 bp mtDNA-Fragment konnten dagegen in einigen Proben amplifiziert werden.

Beide eingesetzte PCRs zeigten einen Rückgang der Signale je stärker der Knochen verbrannt war. Abhängig von der erreichten Temperatur im Knochengewebe kommt es zu einer Degradation des organischen Materials, welches nicht mehr vom Knochenmineral geschützt wird. Anschließend verbrennt der organische Kohlenstoff vollständig und die anorganischen Bestandteile nehmen zu. Es findet eine chemische Umwandlung im Knochen statt, die auch die DNA-Moleküle betrifft [Grupe 2005, Devlin & Herrmann 2008, Herrmann et al. 1990].

Neben Schwierigkeiten infolge weniger oder degradiertem DNA sind PCR-Inhibitoren ein Hauptproblem in der Forensik [Lindahl 1993, Moreira 1998, Sutlovic et al. 2005]. Bei der Verbrennung eines Menschen können die Überreste mit anorganischen Bestandteilen, z.B. aus Möbeln oder Kleidung, verschmelzen, welche zu einer Hemmung in der PCR führen können [Biesecker et al. 2005]. Deshalb ist es meist schwierig zu entscheiden, ob ein negatives PCR-Ergebnis auf einen Verlust an amplifizierbarer DNA oder auf PCR-Inhibitoren zurückzuführen ist. Durch den zusätzlichen Nachweis eines Hydrafragments als Qualitätssensor in der Screening-PCR ist eine Unterscheidung gegeben. Wird nur das Hydrafragment analysiert, ist die Probe DNA-frei und enthält keine Inhibitoren [von Wurmb-Schwark et al. 2009]. Alle untersuchten Knochenproben zeigten nach der Screening-PCR das Hydra-Fragment, so dass die Komplettausfälle einiger Proben auf den Verlust an amplifizierbarer DNA zurückzuführen waren.

6.4.3 Möglichkeit der Identifizierung über STR-Analyse

In die STR-Analyse kamen nur Proben zur Anwendung, die in den Vortests Signale für nukleäre DNA aufwiesen. Zusätzlich wurden bei der Auswertung ausschließlich Systeme gezählt, die vollständig vorlagen und über 200 rfu groß waren.

Bei der STR-Analyse der Gruppe I und II traten keine Probleme auf. Aus fast allen Proben konnten vollständige Profile amplifiziert werden, die für eine Identifizierung ausgereicht hätten. In der Gruppe II gelang in drei Proben der Nachweis von 9-6 STRs. Unter Umständen könnten diese Werte sogar noch mit der Datenbank (z.B. Bundeskriminalamt) abgeglichen

werden, in der zur Zeit eine Mindesteingabe von fünf Datenbanksystemen möglich ist. Daher wäre auch in diesen Fällen eine Identifizierung durchführbar.

Die Gruppe III (schwarz verbrannt) zeigt auch mit dieser Analysemethode ein sehr heterogenes Bild. Bei acht von 23 Proben (35 %) wäre eine Identifizierung durchführbar. Bei den restlichen Proben konnten maximal fünf STR-Systeme amplifiziert werden. Mit dieser geringen Zahl ist nur ein Ausschluss sicher möglich. In den anderen beiden Gruppen gelang die STR-Amplifikation nur sporadisch. Lediglich bei einer Probe aus Gruppe V konnten acht STR-Systeme detektiert werden. Diese Probe und noch zwei weitere aus Gruppe IV und V waren der Brandleiche zuzurechnen, die in den Tabellen vier und fünf unter Nummer fünf näher beschrieben ist. Die drei Proben stammten aus dem Schädel, Schulter und Beckenbereich der Brandleiche. In diesen Körperbereichen waren noch verkohlte Weichteilgewebsreste vorhanden. Trotz der Reinigung der Knochen vor der Analyse kann angenommen werden, dass Blut oder die Weichteilreste die poröse Knochenoberfläche kontaminiert hatten. Dies wäre eine Möglichkeit zur Erklärung der relativ guten Ergebnisse im Vergleich zu den anderen Knochenproben aus den Gruppen IV und V. Gestützt wird diese These auch durch die ebenfalls guten Ergebnisse dieser Proben in den anderen angewandten PCRs.

Trotz dieser Proben sind die Ergebnisse der STR-Analyse nicht zufriedenstellend. Zwar konnten bei einigen schwarz verbrannten Knochen gute Profile erzielt werden, dagegen gelang eine Identifizierung in mehr als der Hälfte der Proben mit dieser Methode nicht. Das liegt zum Teil an den relativ großen Fragmenten, die in kommerziellen Kits zum Einsatz kommen. Die Länge der Fragmente beträgt zwischen 100 und 450 bp. Inzwischen haben sich für solche stark degradierten Proben Mini-STRs durchgesetzt. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass die Primer näher an der Zielregion binden und somit die Fragmente unter 200 bp liegen können [Dixon et al. 2006]. Auch in der verwendeten Screening-PCR sind Mini-STRs eingebaut. Wie unter Abbildung 34 gezeigt, ist dort z.B. die Analyse von Amelogenin noch recht lange möglich. Ebenso wird in der Literatur häufig die Analyse von Mini-STRs bei stark degradierten Material empfohlen. Es beschreiben Alonso et al. [2005] und Biesecker et al. [2005], dass auch die stark verbrannten Überreste der Opfer aus dem World Trade Center zum Teil mit Mini-STRs identifiziert wurden, insbesondere wenn die kommerziellen STRs keinen Erfolg brachten. Des Weiteren gibt es sowohl in der Literatur veröffentlichte PCRs zum Nachweis von Mini-STRs [Butler et al. 2003, Asamura et al. 2007] als auch kommerziell erhältliche PCR-Kits (z.B. AmpFISTR[®] MiniFiler[™] PCR Amplification Kit der Firma Applied Biosystems). In dieser Arbeit wurden Mini-STRs nur im Rahmen der Screening-PCR

untersucht, da zum Zeitpunkt der Bearbeitung der Brandleichenproben in der Arbeitsgruppe noch keine weitere PCR mit Mini-STRs etabliert war.

6.4.4 Identifizierung über die Analyse der mtDNA

6.4.4.1 Sequenzierung der mtDNA

Auch bei der Sequenzierung wurden ausschließlich Proben eingesetzt, die in den Vortests Signale für mtDNA aufwiesen. Vorerst erfolgte der Einsatz von 5 µl DNA pro Probe in die PCR. Viele dieser Proben detektierten auf dem Agarosegel keine Signale, obwohl laut Vortests genügend DNA für die Sequenzierung vorhanden gewesen wäre. Besonders die Proben aus Gruppe I und II waren durch viele Ausfälle gekennzeichnet. Dies könnte auf der Tatsache beruhen, dass das Kollagen I, welches den größten Anteil an den organischen Bestandteilen ausmacht, ein potentieller Inhibitor ist [Hummel 2003, Scholz et al. 1998, Kalmar et al. 2000]. Kollagen I wird bei der Extraktion der Proben mit isoliert, wenn nicht vorher eine EDTA-Behandlung erfolgte [Hummel 2003]. Ein weiterer Grund wäre im Vorhandensein von zu viel DNA oder Zyklen zu suchen. Jedoch kann diese Theorie ausgeschlossen werden, weil auf dem Agarosegel kein DNA-Schmier als typisches Zeichen für diese Fehler aufgetreten war [Hummel 2003].

Aufgrund der schlechten Ergebnisse wurden die Proben nochmals mit nur 1 µl DNA in der PCR wiederholt. Hier konnten besonders in den Gruppe I und II starke Signale auf dem Gel detektiert werden. Somit scheint es am wahrscheinlichsten, dass das Kollagen I die PCR durch die hohe Konzentration im 5 µl DNA-Einsatz inhibierte und die Hemmung beim Einsatz von 1 µl DNA überwunden werden konnte.

Die relativ guten Ergebnisse der Sequenzierung des 220 bp Fragments entsprechen wieder der bereits unter 6.4.2 erwähnten Studie von Bender et al. [2004]. Ferner die hohe Anzahl an mtDNA Kopien pro Zelle, ca. 500-1000 [Alonso et al. 2001], spricht für den Erfolg der Methode. Der frühe Ausfall des 439 bp mtDNA-Fragments ist erklärbar, aufgrund seiner Größe und der daraus resultierenden Anfälligkeit für eine Fragmentierung durch Nukleasen.

6.4.4.2 Minisequenzierung der mtDNA

Für die Minisequenzierung wurde die SNP-Analyse zur Bestimmung der Haplogruppen eingesetzt. Dabei konnten sehr erfolgreich die Haplogruppen der Proben aus Gruppe I und II zugeordnet werden. In der Gruppe III gelang bei 82,6 % der Proben noch die Bestimmung der Haplogruppe. Selbst bei den acht Kontrollproben aus Gruppe IV und V funktionierte die Zuordnung der Haplogruppe selbst in einer Probe; und in zwei Proben konnte der Nachweis

von sechs bzw. sieben Signalen erbracht werden. Diese hohe Erfolgsquote basiert auf den kleinen Fragmenten, die in der 1. PCR der Analyse amplifiziert wurden und den untersuchenden SNP umgaben. Diese Fragmente waren zwischen 84 und 180 bp lang; Insgesamt waren nur zwei Fragmente länger als 130 bp. So kann die SNP-Analyse helfen, auch sehr stark degradiertes Material erfolgreich zu analysieren [Budowle 2004a]. Für eine alleinige, eindeutige Identifizierung reichen die untersuchten SNPs auf dem mitochondrialen Genom nicht aus.

Fondevila et al. [2008] gelingt ebenfalls der Nachweis von SNPs an Proben von einem Skelett nach einem Waldbrand in Spanien. Obwohl kommerzielle STR-Kits und Mini-STR-Kits angewandt wurden, gelingt nur der Nachweis von Teilprofilen. Durch den Einsatz zweier Multiplex-PCRs zum Nachweis von 52 und 34 SNPs konnte ein vollständiges Profil aus den Proben amplifiziert werden. Infolge des Einsatzes einer großen Anzahl an SNPs reichen diese, aufgrund der entsprechenden Diskriminanzkraft, für eine alleinige, erfolgreiche Identifizierung aus.

6.4.5 Vergleich der Ergebnisse mit Literaturangaben

Wie die Vortests bereits andeuteten, ist eine STR-Analyse mit kommerziellen Kits an den Proben der Gruppen IV und V nicht zu empfehlen. Des Weiteren ist diese bei den Proben aus Gruppe III nur eingeschränkt möglich. Die Sequenzierung eines kleinen Bereiches der HVI Region dagegen gelingt teilweise noch in den Gruppen mit stark verbrannten Knochen. Jedoch ist dieser Bereich nicht aussagekräftig genug, um einen Menschen zu identifizieren. Daher müssten mehrere kleine Fragmente in der D-Loop-Region des Mitochondrium-Genoms analysiert werden, um einen Ausschluss zu bestätigen. Auch bei den Opfern des World Trade Center Anschlages gelang es nicht, allein über die mtDNA Menschen zu identifizieren [Biesecker et al. 2005]. Am erfolgversprechendsten in dieser Studie ist die SNP-Analyse. Allerdings reicht die hier angewendete Analyse ebenfalls nicht aus, um einen Menschen zu identifizieren. Sie kann nur als ergänzende Untersuchung genutzt werden. Dies ist mit der geringen Mutationsrate und an der rein mütterlichen Vererbung der mtDNA zu begründen [Bär et al. 2000, Fondevila et al. 2008]. Indes würde eine Analyse von 50 bis 60 SNPs auf dem nukleären Genom ausreichen, um eine Identifizierung zu gewährleisten. 50-100 SNPs entsprechen etwa 9-15 STR-Systemen [Budowle 2004a]. Eine hinreichende PCR mit passenden Primer wurde bereits von Sanchez et al. [2006] beschrieben.

Generell wird in der Literatur bei Brandleichen eher empfohlen, noch verbliebende Gewebe oder Organe für eine DNA-Analyse heranzuziehen. Vor allem im Bereich des kleinen Beckens sind die Organe relativ gut vor der Hitze geschützt [Bohnert 2007].

Besonders wichtig ist eine Identifizierung der Brandleichen mittels DNA, wenn aufgrund starker Brandzehrung die Leiche morphologisch nicht mehr einer Person zuzuordnen ist. Dies ist zum Beispiel nach Massenkatastrophen bei der Entwicklung hoher Temperaturen [Holland et al. 2003, Sajantila et al. 1991, Budimlija et al. 2003, Meyer 2003], suizidaler Selbstverbrennung [Copeland 1985, Bohnert & Rothschild 2003] oder Autounfällen sowie Unfällen im Haushalt mit Brandentwicklung [DiMaio & DiMaio 1993] häufig gegeben. In einigen Fällen wird das Feuer auch genutzt, um Spuren an einem Tatort zu entfernen, wie z.B. nach einem Einbruch oder Mord [Fantón et al. 2006]. Hier können als Ergebnis nur noch Knochen für eine DNA-Analyse vorliegen.

Anhand der vorliegenden Resultate kann gezeigt werden, dass sich kaum verbrannte und halb verbrannte Knochen gut für eine DNA-Analyse eignen. Schwarz verbrannte Knochen dagegen zeigen ein sehr heterogenes Bild. Abhängig von den allgemeinen Bedingungen der Brandleichen enthalten einige schwarz verbrannte Knochen ausreichend DNA für eine Identifizierung, während andere Proben keine DNA mehr aufwiesen. Die Gründe dafür sind in den unregelmäßigen und oft unbekannten Verbrennungsbedingungen, wie Zeitdauer und Temperatur, zu suchen. Knochen, die durch Weichgewebe und Muskeln lange geschützt werden, wie z.B. Femurknochen oder Beckenknochen, sind einer genetischen Analyse vorzuziehen. Ein authentisches STR-Profil einiger Systeme aus blau-grau oder blau-grau-weiß verbrannten Knochen ist nur sehr sporadisch möglich. Besser geeignet für diese Knochen ist die Sequenzierung oder Minisequenzierung der mtDNA, die zumindest einen Ausschluss feststellen lässt.

6.5 Mögliche Identifizierung von Fäulnisleichen in Abhängigkeit zum Verwesungsgrad

Ziel bei der Untersuchung der Fäulnisleichen war eine Vergleichsanalyse zwischen Rippen und verschiedenen Organen im Bezug zum DNA-Gehalt. Infolge des höheren Arbeitsaufwandes während der DNA-Extraktion aus Knochengewebe gegenüber der DNA-Isolierung aus Organgewebe soll überprüft werden, ob die Qualität der DNA aus Rippen besser sei, um diesen Aufwand zu rechtfertigen.

6.5.1 Auswahl der untersuchten Proben

Die Anzahl der untersuchten Leichen in den einzelnen Gruppen war besonders in der Kontrollgruppe und in der Gruppe beginnende Fäulnis sehr gering. Dies beruht auf der Tatsache, dass Leichen mit einer beginnenden Fäulnis meist nicht molekulargenetisch identifiziert werden müssen. Daher werden, während der Sektion, auch keine Organproben entnommen. Die Untersuchung der Rippe ist durch die einfache Entnahme während der Sektion bedingt. Eine Entnahme eines Knochenstückes vom Femur dagegen, der wahrscheinlich bessere DNA-Ergebnisse aufweisen würde, ist präparatorisch sehr arbeitsintensiv.

6.5.2 Zustand der DNA-Qualität und Quantität der Proben

Die 20 untersuchten Rippenproben wurden zunächst in die Screening-PCR eingesetzt, um zu überprüfen, ob bei Zugabe von 1 µl DNA-Lösung in die verwendeten PCRs die Reaktion inhibiert wurde. Auch bei diesen Proben fand vor der Extraktion keine Dekalzifizierung statt. Dadurch hätte die Anwesenheit von Kollagen I die PCRs hemmen können [Kalmar et al. 2000]. Keine Rippenprobe wies einen Ausfall des Hydrafragments auf. Demzufolge ist eine Hemmung der Knochenfragmente beim Einsatz von 1µl DNA-Lösung auszuschließen.

Die Quantifizierung erfolgte durch den Einsatz eines kommerziell erhältlichen Realtime-PCR-Kits und der Duplex-PCR. Beide Verfahren zeigten einen erwarteten Abfall für die nukleäre DNA. In den Durchschnittswerten für die mtDNA-Signale in der Duplex-PCR war dieser Abfall der Signalintensität nicht so stark zu beobachten. Erst in der Gruppe höchstgradige Fäulnis war ein starker Rückgang bei den Leberproben nachweisbar. Diese Werte sprechen für eine starke Degradation der Proben, wobei die relativ hohen Signale für die mtDNA auf deren hohe Kopienanzahl zurückzuführen sind. Zusätzlich ist bekannt, dass Nukleasen eher die lineare nukleäre DNA angreifen als den zirkulären Ring der mtDNA [Foran 2006]. Hierdurch ist die mtDNA besser gegen Strangbrüche geschützt und länger nachweisbar. Die starken Schwankungen bei den Ergebnissen aus der Realtime-PCR bestätigen ebenfalls die These der vorliegenden starken Degradation besonders der nDNA.

Aus den vier Fällen, die stellvertretend in die Realtime-PCR eingesetzt wurden, ist ersichtlich, dass der Rückgang des DNA-Gehaltes in den Proben vom Fäulnisgrad abhängig ist. Der Leichnam 19 (siehe Tab. 6) zeigte Mumifizierungserscheinungen, als er in seiner Wohnung gefunden wurde. Dies ist signifikant für eine schnelle Austrocknung, welche die Aktivität der Nukleasen vermindert und so den DNA-Gehalt begünstigt [Hofreiter et al. 2001]. Der

Leichnam 26 (höchstgradige Fäulnis) dagegen war durch Schimmel gekennzeichnet, was auf eine feuchte Umgebung schließen lässt. Dies begünstigt Autolyse- und Fäulnisprozesse und erklärt die schlechte nDNA-Erhaltung in den Geweben.

6.5.3 Identifizierung über STR-Systeme und Sequenzierung

Die besten Ergebnisse konnten aus den DNA-Proben der Nieren- und Lebergewebe amplifiziert werden. Ebenfalls gute Ergebnisse zeigten die DNA-Proben aus Muskel- und Aortagewebe. Die DNA der Rippenproben wies einen gleichmäßigen Abfall der erfolgreich amplifizierten Systeme auf und eignete sich nicht optimal für eine STR-Analyse.

Eine ältere Studie von Bär et al. [1988], die die Degradation von verschiedenen Geweben vergleicht, konnte mittels RFLP-Analyse aufzeigen, dass der DNA-Gehalt im Nierengewebe gut mit der Todeszeit korreliert und nach fünf Tagen eine vollständige Degradation vorliegt. Die untersuchten Leberproben dagegen wiesen nach 24-36 Stunden starke Degradationserscheinungen auf. Eine gute DNA-Stabilität konnte er für Lendenmuskelproben feststellen. In den eigenen Ergebnissen detektierten die Nieren und Leberproben bessere Ergebnisse als Muskelgewebe. Auch Ludes et al. [1993] bestätigten die Ergebnisse. Nach 20 Tagen gelang es ihnen, durch den Einsatz von Single-Locus-Sonden, noch DNA in Leber und Niere und etwas geringer in Muskelproben nachzuweisen. Die beste DNA-Erhaltung stellten sie in Gehirnproben fest.

Die schlechteren Ergebnisse der Rippen können auch auf die geringere Anzahl an Zellen im Knochengewebe zurückgeführt werden. Der Knochen eines erwachsenen Menschen besteht aus 62 % anorganischen Substanzen [Leonhardt 1990]. Das Lebergewebe dagegen enthält in einem geringen Prozentsatz tetraploide Leberzellen, die 92 Chromosomen besitzen. Auch im Muskelgewebe sind Zellen mit mehreren Kernen existent [Brinkmann & Wiegand 1997]. Demzufolge sind die besseren STR-Ergebnisse der Organe erklärbar.

Bei der Sequenzierung der Proben gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geweben. Wie bereits unter 5.5.4 erläutert, entstanden die Abweichungen durch den Ausfall einer Probe. Somit gelang die Sequenzierung in fast allen Proben und bestätigte die Ergebnisse der Duplex-PCR, in der ebenfalls in allen Gruppen ein mtDNA-Signal amplifiziert werden konnte. Da das eingesetzte Fragment in der Sequenzierung fast doppelt so groß gegenüber dem in der Duplex-PCR war, kann sogar von einem noch geringeren Degradationsgrad der mtDNA ausgegangen werden.

6.5.4 Vergleich der Ergebnisse mit Literaturangaben

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass in allen untersuchten Gewebeproben ausreichend mitochondriale DNA für weitergehende Untersuchungen wie Sequenzierungen vorhanden war. Die nukleäre DNA wies einen erwarteten Abfall der Signalintensitäten und den teilweisen Ausfall von STR-Systemen auf. Trotzdem gelang es in den meisten Proben, ein Teilprofil zu erstellen, welches für eine Identifizierung genutzt werden konnte. Zudem wurden in der Routinearbeit mehrere Organe aufgearbeitet, die einen Vergleich der Ergebnisse untereinander ermöglichten. Die aufwendigere, zusätzliche Extraktion und Analyse der Rippenknochen war, den Ergebnissen zufolge, nicht zwingend erforderlich.

Auch in der Literatur wird die Analyse aus Weichgeweben, besonders von Skelettmuskel und Organgewebe, bevorzugt. Hartgewebe sollte erst bei starken Fäulniserscheinungen extrahiert werden. Wenn das Weichgewebe durch selbiges anderer Leichen kontaminiert sein könnte, wie z.B. in einem Massengrab, sind ebenfalls Knochen zu bevorzugen [Alonso et al. 2005, Budimlija et al. 2003].

Bei der Auswahl der Knochen sollte zudem auf Rippe verzichtet werden. Anhand einer Untersuchung an den Opfern des Jugoslawienkonfliktes konnte gezeigt werden, dass besonders Knochen mit einer hohen Dichte einen guten DNA-Gehalt aufwiesen, welches auf die enge Bindung von DNA an Hydroxylapatit zurückzuführen war. Bei der Auswertung von über 25.000 Knochen und Zähnen stellte sich heraus, dass Femur und Zahn aufgrund ihrer hohen Dichte den höchsten DNA-Gehalt aufwiesen. Clavicula, Ulna und Radius detektierten die schlechtesten Ergebnisse. Rippen wurden aufgrund des geringen DNA-Gehaltes gar nicht erst untersucht [Milos et al. 2007].

Da Fäulnisprozesse meist im Bauchraum beginnen und sich in den Brustraum fortsetzen, sind die Rippen sehr zeitig von den Abbauprozessen betroffen. Der Femurknochen ist meist durch die Muskulatur eine längere Zeit geschützt. Daher wird während der Sektion (im Institut für Rechtsmedizin Kiel) bei stark fäulnisveränderten Leichen nicht der M. iliopsoas entnommen, sondern ein Oberschenkelmuskel.

Andelinovic et al. [2005] gelang keine Typisierung der Rippen-, Unterkiefer- und Calcaneusknochen bei den Kriegsopfern aus Bosnien. Auch er erzielte die besten Ergebnisse bei den Femurknochen. Somit stimmen diese Ergebnisse mit denen aus dieser Arbeit überein: Die untersuchten Rippen waren stärker degradiert als die Organe und voraussichtlich wäre eine Typisierung mittels STR-Systemen bei fortschreitender Fäulnis ebenfalls nicht mehr gelungen.

Ebenso untersuchten auch Deng et al. [2005] bei den Tsunamiopfern nur kompakte Knochen und Zähne. Trotz der starken Verwesung und des feucht-heißen Klimas gelang ihnen der Nachweis von STR-Systemen aus den Knochen. Die Zähne amplifizierten nur noch mtDNA, weil die Opfer mehrere Tage im Wasser mit dem Kopf nach unten schwammen und so die DNA in den Zähnen stark degradiert vorlag.

All diese Ergebnisse begründen, dass Organgewebe solange wie möglich für eine Identifizierung vorrangig genutzt werden sollte. Ist die Fäulnis stark fortgeschritten, sind Knochen mit einer hohen Dichte zu bevorzugen. Aufgrund der relativ schlechten Ergebnisse der Rippenproben ist dieser Knochen für die Identifizierung stark fäulnisveränderter Leichen als nicht geeignet einzustufen.

7 Ausblick

Auf der Grundlage der Ergebnisse, die mit Hilfe der verschiedenen PCR-Methoden gewonnen wurden, können weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Eine noch intensivere Überprüfung der DNA aus den Leichenbränden hinsichtlich Kontaminationen wäre erachtenswert. Es könnten zum einen die archäologischen Befunde der Gräberfelder, wenn vorhanden, mit den nachgewiesenen Haplotypen bezüglich Verwandtschaftsfragen verglichen werden. Wenn diese Ergebnisse übereinstimmen, wäre das ein weiterer Hinweis darauf, dass die extrahierte DNA authentisch ist. Zum anderen sollte durch die Etablierung weiterer SNPs, wie z.B. der 52-SNP-PCR von Sanchez et al. [2006], eine bessere Kontaminationsaufdeckung gewährleistet werden können. Zusätzlich wäre mit dieser Analyse eine bessere Identifizierung von einzelnen Proben gegeben. Ferner könnten die Proben in Zukunft in eine SNP-Analyse eingesetzt werden, die Phänotypen nachweist und momentan im Rahmen einer Doktorarbeit im Institut etabliert wird. Mit der in dieser Arbeit etablierten Methode gelingt nur die Einordnung in eine größere Population. Dadurch können Ausschlüsse von Kontaminationen, bedingt durch die bearbeitenden Personen, festgestellt werden; jedoch für weitere Untersuchungen mit archäologischem Kontext reichen die eingesetzten Polymorphismen nicht aus.

Es zeigte sich, dass die entwickelten SNP-PCRs sehr sensitiv sind. Es wäre demzufolge besonders bei der Untersuchung von forensischen Proben eine Weiterentwicklung der SNP-Analyse sinnvoll. Gerade der Einsatz von nukleären SNPs bei stark degradierten Proben (Brandleichen) ist empfehlenswert, wenn keine STR-Analyse mehr ausführbar ist [Alonso et al. 2005]. Besonders die bereits oben erwähnte 52-SNP-PCR eignet sich gut, um Minimalspuren in der Forensik zu untersuchen [Musgrave-Brown et al. 2007]. Auch für Vaterschaftsanalysen, die ein oder zwei Abweichungen durch Mutationen aufweisen, könnten mit dieser SNP-Analyse untersucht werden. Da die SNPs eine geringere Mutation aufweisen als STRs, gelingt so entweder eine Bestätigung der Vaterschaft oder ein bestätigter Ausschluss [Børsting et al. 2008].

Anhand der Ergebnisse der fäulnisveränderten Leichen empfiehlt sich eine weitere Untersuchung an anderen dichteren Knochenmaterial und Zähnen, um die Literaturwerte zu bestätigen und eventuell die Entnahme einer anderen Knochenprobe als die Rippe -zusätzlich zu den Organen während der Sektion- zu bevorzugen. Zusätzlich wäre auch der Einsatz von SNPs bei diesen Proben sinnvoll.

8 Zusammenfassung

In dieser Arbeit ist es gelungen, durch bereits etablierte Methoden sowie der Entwicklung einer SNP-Analyse und einer Veränderung der Extraktionsmethode, DNA aus stark degradierten Proben mit historischem und forensischem Hintergrund zu amplifizieren. Somit konnten die Hauptziele der Arbeit erfolgreich umgesetzt werden.

Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Etablierung einer PCR zum Nachweis von mitochondrialen SNPs, welche eine Einordnung in eine Haplogruppe ermöglichen. Des Weiteren wurde eine SNP-Analyse entwickelt, die die Untergruppen, der am häufigsten in Europa vorkommenden Haplogruppe H, detektiert. Mit den verwendeten Primersequenzen aus der Literatur und veränderten Konzentrationen sowie modifiziertem PCR-Protokoll konnte eine Nachweisgrenze nach der Kapillarelektrophorese auf dem ABI Prism 310 von 500 fg erzielt werden. Die Überprüfung der Funktionsfähigkeit der Primer erfolgte mit DNA-Proben, deren Haplogruppen bekannt waren. Anschließend wurden forensische Proben aus der Routine-Arbeit eingesetzt, die viele Ausfälle in den analysierten STR-Systemen aufwiesen. Mit Hilfe der entwickelten SNP-PCR gelang die Zuordnung einer Haplogruppe in den meisten Fällen.

Der zweite Teil der Arbeit beinhaltet die Optimierung der Extraktionsmethode für historisches Material, indem ein Dekalzifizierungsschritt mittels EDTA und ein Silica-basierendes Extraktionskit zum Einsatz kommt. Weiterhin wurden mit Hilfe von Bleiche die Knochenproben erfolgreich dekontaminiert.

Bei der Bearbeitung der Leichenbrandproben aus fünf Urnengräberfeldern (Gremersdorf, Süderbrarup, Sörup II, Norderbrarup und Scharbeutz) der vorrömischen Eisenzeit und der römischen Kaiserzeit führte der DNA-Nachweis mittels Duplex-PCR in etwa 13 % der Proben zum Erfolg. Reproduziert werden konnten die DNA-Ergebnisse nur in 25 % der Fälle. Mit Hilfe der neu etablierten SNP-PCR gelang bei einigen Proben die Zuordnung einer Haplogruppe, die in den meisten Fällen nicht mit der des Bearbeiters im Labor übereinstimmte. Insgesamt sind vier DNA-Quellen für die DNA-Ausbeute aus den Leichenbränden in Betracht zu ziehen: a) Kontaminationen im Labor, die auch bei DNA-freien Negativkontrollen nie mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden können; b) durch frühere Bearbeitungen des Leichenbrandes, da die meisten Urnen bereits geöffnet waren; c) DNA-Schäden, die zu einem Falscheinbau von Basen führen und so die Ergebnisse

verfälschen und/oder d) authentische DNA, die durch den geringeren Verbrennungsgrad des Leichenbrandes erklärt werden kann.

Anhand der forensischen Brandleichen konnte gezeigt werden, dass sporadisch DNA in stark verbrannten Knochen detektierbar ist. Ferner war die Anzahl an reproduzierbaren DNA-Ergebnissen aus Leichenbränden sehr gering, ähnlich wie in den stark verbrannten Knochen der forensischen Brandleichen. Aufgrund dieser Ergebnisse ergibt sich, dass die amplifizierte DNA aus einigen Leichenbränden authentisch ist, besonders wenn mehrere Knochenproben aus einer Urne die gleichen Ergebnisse liefern. Daher ist eine Mehrfachbeprobung der Urnen sehr wichtig.

Die Analyse von Knochenmaterial unterschiedlicher Verbrennungsstadien von forensischen Brandleichen wies weiterhin nach, dass es mit herkömmlichen STR-Analysen möglich ist, auch schwarz verbrannte Knochen, abhängig vom individuellen Verbrennungsgrad der Leiche, zu typisieren. In stärker verbrannten Knochen war gegebenenfalls nur noch mitochondriale DNA nachweisbar. Diese konnte mit Hilfe der SNP-Analyse und zum Teil der Sequenzierung eines 220 bp Fragmentes amplifiziert werden.

Bei der Auswertung der Ergebnisse der stark fäulnisveränderten Leichen zeigte sich, dass Rippenknochen für eine STR-Analyse weniger geeignet sind als Organproben (Niere, Leber). Dies lässt sich anhand der geringeren Zellzahl im Knochen gegenüber Organen erklären. In der Bestimmung der mitochondrialen DNA konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Rippen- und Organproben festgestellt werden. Bei sehr stark fäulnisveränderten Leichen wird vorrangig die Entnahme eines Knochens mit einer höheren Dichte empfohlen, da die DNA in diesen besser vor Degradation geschützt ist.

Als Ergebnis dieser Arbeit lässt sich zusammenfassen, dass der Einsatz von mitochondrialen SNPs -in der Forensik und bei historischen Proben- die zur Zeit sensibelste Methode darstellt, um aus stark degradierten Proben DNA zu amplifizieren.

9 Summary

This study shows that it is possible to amplify DNA from strongly degraded historical and forensic samples by using established methods as well as a newly developed SNP-analysis and a modified extraction method. The study's main aims were achieved successfully.

The first part deals with the establishment of a PCR for detecting mitochondrial SNPs, which enables the classification of haplogroups. Furthermore a SNP-analysis was developed to differentiate between the Haplogroup H subgroups. This Haplogroup is the most common one in Europe. With the used primer sequences (published in literature), modified concentrations as well as a changed PCR-protocol a detection limit of 500 fg could be accomplished after capillary electrophoresis with an ABI Prism 310. The primer functionality was verified with the use of DNA samples containing known haplogroups. Afterwards the new method was applied on forensic routine samples that had failed to deliver STR profiles. By using the newly developed SNP-PCR, a classification into haplogroups was possible in most cases.

In the second part of this study an improvement of the extraction method for historical material was achieved by using a decalcification step with EDTA and the adoption of a silica based extraction kit. Using bleach it was possible to successfully decontaminate bone samples.

During the work on the historical cremains taken from five urn fields (Gremersdorf, Süderbrarup, Sörup II, Norderbrarup and Scharbeutz) from the pre-Roman-iron age and the Imperial Roman Period, DNA was detected successfully in 13% of the samples by using Duplex-PCR. However, 25 % of these samples showed reproducible results. In some cases a classification of the haplogroups was possible with the help of the new SNP-PCR and most samples did not match with the haplotype of the person working with the samples. Altogether, three possible DNA-sources for the DNA-yield of the historical cremains may exist: a) lab-contaminations which can never be completely excluded even in case of DNA-free negative controls; b) DNA-damages which lead to base misincorporations and false interpretation of the results; and c) authentic DNA which is explainable by the lower level of burning.

The examinations of modern forensic fire deaths indicate that only sometimes DNA can be detected in severely burned bones. Furthermore, only a small number of reproducible DNA-results was achieved in historical cremains, just like in the examination of the severely burned bones of the forensic fire deaths. On the basis of these results, it becomes clear that the amplified DNA is authentic in some historical cremains, especially in cases where bone

samples from the same urn show the same results. Therefore it is important to take several samples from the same urn.

The analysis of bone material from modern forensic fire deaths showing different burning levels indicates furthermore that the characterisation by conventional STR-analysis is also possible in black-burned bones depending on individual burning conditions. In severely (white or grey) burned bones, only the detection of mitochondrial DNA was possible. This DNA was successfully characterized by sequencing of a 220 basepair fragment or SNP-analysis.

The examination of highly putrefied bodies proves that rib bones are less appropriate for STR-analysis than organ samples like kidney or liver. This can be explained by the lower cell number in bones compared to organs. No significant difference was observed for the mitochondrial DNA in rib or organ samples.

In highly putrefied bodies it is better to analyse a bone with a higher density due to the better protection of the DNA against degradation.

In conclusion, this study shows that the analysis of mitochondrial SNPs in forensics and in historical remains is currently the most sensitive method at this time to amplify DNA from high degraded samples.

10 Anhang

10.1 Auflistung der untersuchten Urnen

Tab. A1: Übersicht über die bearbeiteten Urnen aus den jeweiligen Gräberfeldern.

Die Urnen aus Süderbrarup sind in Tab A2 widergegeben. * Urnen waren noch nicht geöffnet

Gremersdorf	Sörup II	Norderbrarup	Scharbeutz
410	160	18	249
411	81	30	162*
202	96	34	201
203	162a	40	172*
208	162b	43	248*
406			38
378			133*
			173*
			156
			269*
			192
			231
			171
			185

Tab. A2: Ausgewählte Ergebnisse infolge der anthropologischen Bearbeitung von Leichenbränden aus Süderbrarup, die auch in dieser Arbeit untersucht wurden [aus: Wahl 1988].

Grabnummer	Gewicht (in g)	Fragmentgröße	Körperhöhe (in cm)	Alter	Geschlecht
156a	250	klein-(mittel)	-	spätadultus	♀
291	1075	klein	163,7	maturus	♀
356	350	klein/mittel	-	senilis	♀
648	265	klein	-	adultus oder älter	eher ♀
671	525	klein	-	spätjuvenis-adultus	♀
725	185	sehr klein – (klein)	-	juvenis oder älter	eher ♀
729	225	(klein)-mittel	-	adultus oder älter	♀
765	245	klein	161,4	maturus-senilis	♀
809	930	(klein)-mittel	154,4	frühadultus	♀

10.2 Systematische Einordnung von Hydra

Reich: Eukaryota, **Unterreich:** Metazoa, **Stamm:** Cnidaria, **Klasse:** Hydrozoa, **Ordnung:** Hydroida, **Unterordnung:** Capitata, **Familie:** Hydridae

10.3 Geräte und Materialien

Probenvorbereitung und DNA-Extraktion

- Brutschrank Incubat, MELAG
- DNA-Workstation UV-Cleaner UVC/T-M-AR, KISKER
- Kugelschwingmühle MM200, RETSCH
- Waage SAC62, SCALTEC
- Thermomixer comfort mit 1,5 ml Thermoblock, EPPENDORF
- Tischzentrifuge 5415C, EPPENDORF
- Vortex Genie[®] 2[™], SCIENTIFIC INDUSTRIES INC.
- Invisorb[®] Gyrator, INVITEK
- Gefrierbeutel 1L, RUBIN
- Einmalskalpell, FEATHER
- Gummihammer
- Mundschutz, HARTMANN
- Zahnbürste, PERLODENT

Agarose-Gelelektrophorese

- Horizontale Gelelektrophorese-Einheit MIDI, ROTH
- Gelkammer Horizon 11·14, GIBCO BRL
- Gelkammer Horizon 58, GIBCO BRL
- Electrophoresis Power Supply ST 304, GIBCO BRL
- Microwave 800, SEVERIN
- Gel Doc EQ, BIORAD

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

- Glasplatten
- GelBond-PAG Trägerfolie, BIOZYM
- Magnetrührer IKAMAG RH, Janke & Kunkel
- Multiphor II Electrophoresis System, horizontale PAGE-Kammer, PHARMACIA BIOTECH
- Kühlgerät Multitemp III, PHARMACIA BIOTECH
- Electrophoresis Power Supply ST304, GIBCO BRL
- Schüttler GFL Type 3015, Gesellschaft für Labortechnik mbH
- Sample Appl Piece, PHARMACIA BIOTECH
- Elektrodenstreifen
- Gel DOC EQ, BIO-RAD
- Kopierfolie, PELIKAN
- durchsichtiges Klebeband, TESA

PCR

- 7300 Real Time PCR System, APPLIED BIOSYSTEMS
- DNA-Workstation UV-Cleaner UVC/T-M, KISKER
- Thermocycler GeneAmp® PCR System 2700, APPLIED BIOSYSTEMS
- Vortex Genie 2, SCIENTIFIC INDUSTRIES INC.
- Microzentrifuge, ROTH
- Zentrifuge (für Platten) LMC-3000, KISKER
- Thermofast® 96 Detection Plate, ABGENE
- Optical Adhesive Cover Folie, APPLIED BIOSYSTEMS

Fragmentanalyse

- ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer, APPLIED BIOSYSTEMS
- GeneScan® Analysis Software Version 3.1.2, APPLIED BIOSYSTEMS
- Sequencing Analysis Software Version 3.4.1, APPLIED BIOSYSTEMS
- Genetic Analyzer Sample Tubes 0,5 ml, APPLIED BIOSYSTEMS
- Genetic Analyzer Septa, APPLIED BIOSYSTEMS

10.4 Reagenzien und Chemikalien

- ABI PRISM® SNaPshot® Multiplex Kit, APPLIED BIOSYSTEMS
- ABI BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, APPLIED BIOSYSTEMS
- Acrylamid/Bisacrylamid-Fertiglösung (Rothiphoresegel 40 (19:1)), ROTH
- Agarose LE, BIOZYM
- Ameisensäure, MERCK
- AmpFlSTR® Identifiler® Multiplex Kit, APPLIED BIOSYSTEMS
- AmpliTaq Gold Polymerase, APPLIED BIOSYSTEMS
- Ammoniumpersulfat (APS) 10 %, SERVA
- Aqua bidest, H₂O HPLC analyzed, J.T. BAKER
- Bleiche (DanKlorix von COLGATE-PALMOLIVE)
- Borsäure, MERCK
- Bromphenolblau, MERCK
- Dimethylsulfoxide (DMSO), Q·BIO GENE
- DNA-Exitus Plus™, AppliChem
- dNTP Mix, 2,5 mM each, BIOLINE
- Dye Ex Kit, QIAGEN
- EDTA (Ethylendiaminotetraacetat), 0,5 M, pH 8, ROTH
- Essigsäure 100 % (verdünnt auf 10%), ROTH
- Ethanol absolut, J.T.Baker
- Ethanol vergällt (99 % Ethanol und 1 % Petroläther), Büfa
- Ethidium Bromide Solution (10mg/ml), INVITROGEN
- ExoSAP-IT®, USB CORPORATION

- Ficol 400, SIGMA
- Formamid Hi-Di, APPLIED BIOSYSTEMS
- Formaldehyd 37% (benötigt 0,04 %)
- GeneScanTM – 500 LizTM Size Standard, APPLIED BIOSYSTEMS
- GeneScanTM – 500 RoxTM Size Standard, APPLIED BIOSYSTEMS
- GeneScanTM – 120 LizTM Size Standard, APPLIED BIOSYSTEMS
- Glycerin 100 % (verdünnt auf 10 %), MERCK
- HyperladderTM I, IV, V; BIOLINE
- ImmoBuffer 10x, BIOLINE
- ImmolaseTM DNA Polymerase, BIOLINE
- Internal Lane Standard 600, PROMEGA
- Invisorb Spin PCrapid Kit, INVITEK
- Invisorb[®] Forensic Kit I, INVITEK
- Invisorb[®] Spin Forensic Kit I, INVITEK
- Invisorb[®] Spin Tissue Mini Kit, INVITEK
- Magnesiumchlorid 50 mM, BIOLINE
- MinElute[®] PCR Purification Kit, QIAGEN
- Natriumcarbonat, MERCK
- Powerplex ES Multiplex Kit, PROMEGA
- Proteinase K, BIOLINE
- QIAquick[®] Nucleotide Removal Kit, QIAGEN
- Quantifiler Human DNA Quantification Kit, APPLIED BIOSYSTEMS
- Salpetersäure 65 % (verdünnt auf 1 %), ROTH
- Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), PROMEGA
- Silbernitrat, MERCK
- Tetramethylethylenediamine (TEMED), SERVA
- Tetramethylethylenediamin (TMAC), SIGMA
- Tris (Trishydroxymethylaminomethan, SERVA
- Xylencyanol, FLUKA
- Zelllinie: Standard: Human Genomic DNA: Female 232,2 µg/ml, PROMEGA

Ansätze der Lösungen und Reagenzien

- Entwicklerlösung für Silberfärbung: Natriumcarbonat (0,28 M) und Formaldehyd (0,04%)
- Ladepuffer für Agarosegele: in 100 ml sind 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylene-Cyanol, 25 % Ficoll 400
- Ladepuffer für Elektrodenstrips: TB-Puffer (0,5 M Tris, 0,28 M Borsäure, 0,5 % Bromphenolblau)
- Puffer für Agarosegele: TBE-Puffer 5x (270 g TRIS, 137,5 g Borsäure, 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8)
- Silbernitratlösung 3% mit destilliertem Wasser auf 200 ml auffüllen
- Tris-Formiat (0,5 M Tris, 0,12 M Ameisensäure)

10.5 getestete Primerkonzentrationen während der SNP-Etablierung

Tab. A3: Qualität der Signale in Abhängigkeit der Primer.

In der 2.Spalte sind zuerst die Konzentrationen der Amplifikations-PCR und dann der SNaPshot-PCR angegeben.

SNP	Konzentration in μM	Lauf mit Extensionsprimern von Roth	Lauf mit Extensionsprimern (HPLC aufgereinigt) von Biomers
7028	0,25 / 0,15	Peak ist groß und läuft gut	
3010	0,15 / 0,15	Peak ist groß und läuft gut	
4769	0,15 / 0,25	Peak hat 2 Spitzen sonst gut	Peak mit Farbdurchschlag
4793	0,15 / 0,4	Unruhiger Lauf mit deutlichem Peak	
6776	0,15 / 0,3	sehr unruhiger Lauf mit deutlichem Peak	Sehr großer Peak
3915	0,15 / 0,2	sehr unruhiger Lauf mit riesigen Peak	sehr unruhiger Lauf mit riesigen Peak
3936	0,15 / 0,2	Relativ kleiner Peak	
3992	0,15 / 0,3	Relativ kleiner Peak mit unruhigem Lauf	Deutlicher Peak
456	0,3 / 0,25	deutlicher Peak mit Farbdurchschlägen	
4336	0,25 / 0,15	deutlicher Peak	
3591	0,15 / 0,2	Relativ kleiner Peak mit 3 Spitzen	schöner Peak mit einer Spitze
14470	0,3 / 0,25	Deutlicher Peak	
8448	0,3 / 0,4	Deutlicher Peak mit unruhigem Lauf	
13680	0,15 / 0,2	Deutlicher Peak mit unruhigem Lauf	
7645	0,2 / 0,3	Kleiner Peak mit großem Farbdurchschlag	Deutlicher Peak mit großem Farbdurchschlag
6253	0,15 / 0,2	Deutlicher Peak	

Tab. A4: Zweite SNP-Zusammenstellung mit zwei unterschiedlichen Konzentrationsansätzen.

↑: Konzentration erhöht, ↓: Konzentration verringert. Kein Pfeil: Konzentration blieb gleich analog zur Tabelle A3.

Multi-plex	SNP	1. Versuch		2. Versuch	
		Konz. Amplifikations-primer in μM	Konz. Extensions-primer in μM	Konz. Amplifikations-primer in μM	Konz. Extensions-primer in μM
A	7028	0,25	0,15	0,25	0,15
	3010	0,15	0,15	0,1 ↓	0,15
	3915	0,15	0,15 ↓	0,15	0,015 ↓
	3936		0,3 ↑		0,4 ↑
	3992		0,4 ↑		0,4
	4336	0,3 ↑	0,3 ↑	0,4 ↑	0,4 ↑
	6776	0,15	0,2 ↓	0,1 ↓	0,15 ↓
	6253	0,15	0,15 ↓	0,15	0,15
	8448	0,3	0,3 ↓	0,3	0,3
B	3591	0,2 ↑	0,3 ↑	0,2	0,3
	13680	0,15	0,2	0,15	0,2
	14470	0,3	0,4 ↑	0,3	0,4
	456	0,3	0,3 ↑	0,3	0,3
	7645	0,3 ↑	0,4 ↑	0,4 ↑	0,5 ↑
	4769	0,15	0,25	0,1 ↓	0,2 ↓
	4793		0,25		0,5 ↑

Tab. A5: Konzentrationsänderungen in den beiden Multiplex-PCRs nach der vierten Umstellung der Primer.

Wenn kein Eintrag vorhanden ist, haben sich die Konzentrationen gegenüber Tab. A4 nicht verändert. In der Spalte 5. Versuch sind alle endgültigen Konzentrationen angegeben. Der erste Wert entspricht der Konzentration für die Amplifikationsprimer und der zweite Wert für die Extensionsprimer. ↑: Konzentration erhöht, ↓ Konzentration gesenkt

Multi-plex	SNP	3. Versuch	4. Versuch	5. Versuch
		Konz. in μM	Konz. in μM	Konz. in μM
A	7028	0,3 ↑ / 0,3 ↑		0,4 ↑ / 0,5 ↑
	3010			0,1 / 0,15
	3915	0,1 ↓ / 0,15 ↓	0,01 ↓ / 0,01 ↓	0,01 / 0,01
	4769			0,1 / 0,2
	6253			0,15 / 0,15
	8448			0,4 ↑ / 0,5 ↑
	4336	0,5 ↑ / 0,5 ↑		0,5 ↑ / 0,5 ↑
	14470	0,4 ↑ / 0,4 ↑	0,5 ↑ / 0,5 ↑	0,6 ↑ / 0,6 ↑
B	3591			0,2 / 0,3
	13680	0,2 ↑ / 0,3 ↑		0,2 / 0,3
	6776		0,01 ↓ / 0,01 ↓	0,1 ↑ / 0,15 ↑
	456	0,4 ↑ / 0,4 ↑		0,5 ↑ / 0,5 ↑
	3992	0,3 ↑ / 0,5 ↑		0,3 / 0,5
	3936	0,3 ↑ / 0,5 ↑		0,3 / 0,5
	4793			0,1 / 0,5
	7645	0,5 ↑ / 0,5		0,5 / 0,5

Tab. A6: Angegeben sind die ausprobierten Konzentrationen in μM für die Amplifikations-PCR während der Etablierung der SNP-Analyse für die westeuropäischen Haplogruppen.

SNP	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch	5. Versuch
1719	0,1	0,005	0,005	0,005	0,02
8251	0,125	0,005	0,05	0,05	0,4
8697	0,075	0,005	0,05	0,01	0,2
12372	0,05	0,005	0,005	0,005	0,02
13708	0,05	0,005	0,005	0,005	0,02
14766+14798	0,1	0,005	0,05	0,01	0,024
15904	0,075	0,005	0,005	0,005	0,01
7028	-	-	-	0,4	0,4
3010	-	-	-	0,1	0,1

Tab. A7: Angegeben sind die ausprobierten Konzentrationen in μM für die SNaPshot-PCR während der Etablierung der SNP-Analyse für die westeuropäischen Haplogruppen.

SNP	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch	5. Versuch
1719	0,2	0,02	0,02	0,02	0,03
8251	0,2	0,02	0,2	0,2	0,05
8697	0,2	0,02	0,2	0,02	0,05
12372	0,2	0,02	0,02	0,02	0,02
13708	0,2	0,02	0,02	0,02	0,02
14766	0,2	0,02	0,2	0,02	0,0714
14798	0,2	0,02	0,2	0,02	0,0714
15904	0,2	0,02	0,02	0,02	0,02
7028	-	-	-	0,5	0,5
3010	-	-	-	0,15	0,3

11 Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
aDNA	ancient Desoxyribonucleinacid
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CCD-Kamera	Charge-Coupled Device Kamera
Chr.	Christus
cm	Zentimeter
ct	cycle threshold
d.h.	das heißt
D-Loop	Displacement Loop
DNA	Desoxyribonucleinacid
dNTPs	Desoxynukleotid-Triphosphat
ddATP	Didesoxyadenin-Triphosphat
ddGTP	Didesoxyguanin-Triphosphat
ddNTPs	Didesoxynukleotid-Triphosphat
et al.	et alii / et aliae
fg	Femtogramm
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
HV	hypervariable Region
J	Jahre
kb	Kilobase
M	Molarität
mA	Milliampere
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol

mod.	modifiziert
mt	mitochondriale
mtDNA	mitochondriale DNA
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
nm	Nanometer
nDNA	nukleäre DNA
ng	Nanogramm
PAGE	Polyacrylamidgel
PCR	Polymerasekettenreaktion
pg	Pikogramm
pmol	Pikomol
Pub.-Nr.	Publikationsnummer
rfu	relative Fluoreszenzeinheiten
S	Seite
sek	Sekunden
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
STR	Short Tandem Repeats
T	Thymin
Tab	Tabelle
u.a.	unter anderem
u.ä.	und ähnliche
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultra-violett
V	Volt
W	Watt
z.B.	zum Beispiel
° C	Grad Celsius
%	Prozent

12 Quellennachweis

12.1 Literaturverzeichnis

Accetturo M, Santamaria M, Lascaro D, Rubino F, Achilli A, Torroni A, Tommaseo-Ponzetta M, Attimonelli M (2006)

Human mtDNA site-specific variability values can act as haplogroup markers. *Hum Mutat* 27(9): 965-974

Achilli A, Rengo C, Magri C, Battaglia V, Olivieri A, Scozzari R, Cruciani F, Zeviani M, Briem E, Carelli V, Moral P, Dugoujon J-M, Roostalu U, Loogväli E-L, Kivisild T, Bandelt H-J, Richards M, Villems R, Santachiara-Benerecetti A S, Semino O, Torroni A (2004)

The molecular dissection of mtDNA Haplogroup H confirms that the Franco-Cantabrian glacial refuge was a major source for the European gene pool. *Am J Hum Genet* 75(5): 910-918

Adachi N, Umetsu K, Takigawa W, Sakaue K (2004)

Phylogenetic analysis of the human ancient mitochondrial DNA. *J Archaeol Sci* 31: 1339-1348

Allard MW, Miller K, Wilson M, Monson K, Budowle B (2002)

Characterization of the Caucasian haplogroups present in the SWGDAM Forensic mtDNA dataset for 1771 human control region sequences. *J Forensic Sci* 47(6): 1215-1223

Alonso A, Martin P, Albarran C, Garcia P, de Simon LF, Iturralde MJ, Fernandez-Rodriguez A, Atienza I, Capilla J, Garcia-Hirschfeld J, Martinez P, Vallejo G, Garcia O, Garcia E, Real P, Alvarez D, Leon A, Sancho M (2005)

Challenges of DNA profiling in mass disaster investigations. *Croat Med J* 46(4): 540-548

Alonso A, Andelinovic S, Martin P, Sutlovic D, Erceg I, Huffine E, de Simon LF, Albarran C, Definis-Gojanovic M, Fernandez-Rodriguez A, Garcia P, Drmic I, Rezic B, Kuret S, Sancho M, Primorac D (2001)

DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples. *Croat Med J* 42(3): 260-266

Andelinovic S, Sutlovic D, Erceg Ivkosic I, Skaro V, Ivkosic A, Paic F, Rezic B, Definis-Gojanovic M, Primorac D (2005)

Twelve-year Experience in Identification of Skeletal Remains from Mass Graves. *Croat Med J* 46(4): 530-539

Anderung C, Persson P, Bouwman A, Elburg R, Götherström A (2008)

Fishing for ancient DNA. *Forensic Sci Int Genet* 2: 104-107

Anderson S, Bankier AT, Barrell GB et al. (1981)

Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457-465

- Anslinger K**, Weichhold G, Keil W, Bayer B, Eisenmenger W (2001)
Identification of the skeletal remains of Martin Bormann by mtDNA analysis. *Int J Legal Med* 114(3): 194-196
- Arismendi JL**, Baker LE, Matteson KJ (2004)
Effects of processing techniques on the forensic DNA analysis of human skeletal remains. *J Forensic Sci* 49(5): 1-5
- Armstrong B**, Stewart M, Mazumber A (2000)
Suspension arrays for high throughput, multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping. *Cytometry* 40: 102-108
- Asamura H**, Fujimori S, Ota M, Fukushima H (2007)
MiniSTR multiplex systems based on non-CODIS loci for analysis of degraded DNA samples. *Forensic Sci Int* 173(1): 7-15
- Asari M**, Watanabe S, Matsubara K, Shiono H, Shimizu K (2009)
Single nucleotide polymorphism genotyping by mini-primer allele-specific amplification with universal reporter primers for identification of degraded DNA. *Anal Biochem* 386(1): 85-90
- Ayres KL** (2005)
The expected performance of single nucleotide polymorphism loci in paternity testing. *Forensic Sci Int* 154: 167-172
- Bantelmann N**, (1988)
Süderbrarup Ein Gräberfeld der römischen Kaiserzeit und Völkerwanderungszeit in Angeln. I. Archäologische Untersuchungen. Offa-Bücher Band 63, Karl-Wachholtz Verlag Neumünster.
- Bär W**, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Holland M, Lincoln PJ, Mayr W, Morling N, Olaisen B, Schneider PM, Tully G, Wilson M (2000)
DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: Guidelines for mitochondrial DNA typing. *Int J Legal Med* 113: 193-196
- Bär W**, Kratzer A, Mächler M, Schmid W (1988)
Postmortem stability of DNA. *Forensic Sci Int* 39: 59-70
- Beauval C**, Maureille B, Lacrampe-Cuyaubere F, Serre D, Peressinotto D, Bordes JG, Cochard D, Couchoud I, Dubrasquet D, Laroulandie V, Lenoble A, Mallye JB, Pasty S, Primault J, Rohland N, Pääbo S, Trinkaus E (2005)
A late Neandertal femur from Les Rochers-de-Villeneuve, France. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(20): 7085-7090
- Becker M**, Döhle HJ, Hellmund M, Leineweber R, Schafberg R (2005)
Nach dem großen Brand. Verbrennungen auf dem Scheiterhaufen – ein interdisziplinärer Ansatz. Sonderdruck aus Bericht der Römisch-Germanischen Kommission 86, Verlag Philipp von Zabern, Mainz am Rhein
- Bender K**, Farfan MJ, Schneider PM (2004)
Preparation of degraded human DNA under controlled conditions. *Forensic Sci Int* 139: 135-140

Bender K, Schneider PM, Rittner C (2000)

Application of mtDNA sequence analysis in forensic casework for the identification of human remains. *Forensic Sci Int* 113, 103-107

Bernat M, Titos E, Claria J (2002)

Rapid identification of single nucleotide polymorphisms by fluorescence-based capillary electrophoresis. *Genet Mol Res* 1(1): 72-78

Binladen J, Wiuf C, Gilbert MT, Bunce M, Barnett R, Larson G, Greenwood AD, Haile J, Ho SY, Hansen AJ, Willerslev E (2006)

Assessing the fidelity of ancient DNA sequences amplified from nuclear genes. *Genetics* 172, 733-741

Biesecker LG, Bailey-Wilson JE, Ballantyne J, Baum H, Bieber FR, Brenner C, Budowle B, Butler JM, Carmody G, Conneally PM, Duceman B, Eisenberg A, Forman L, Kidd KK, Leclair B, Niezgoda S, Parsons TJ, Pugh E, Shaler R, Sherry ST, Sozer A, Walsh A (2005)
Epidemiology DNA Identifications after the 9/11 World Trade Center attack. *Science* 310: 1122-1123

Bogenhagen D & Clayton DA (1974)

The number of mitochondrial deoxyribonucleic acid genomes in Mouse L und Human HeLa cells. *J Biol Chem* 249(24): 7991-7995

Bohnert M (2007)

Kraftfahrzeugbrand. *Rechtsmedizin* 17: 175-186

Bohnert M & Rothschild MA (2003)

Complex suicides by self-incineration. *Forensic Sci Int* 131: 197-201

Børsting C, Sanchez JJ, Hansen HE, Hansen AJ, Bruun HQ, Morling N (2008)

Performance of the SNPforID 52 SNP-plex assay in paternity testing. *Forensic Sci Int Genet* 2 (4): 292-300

Bouwman AS, Chilvers ER, Brown KA, Brown TA (2006)

Brief Communication: identification of the authentic ancient DNA sequence in a human bone Contaminated with Modern DNA. *Am J Phys Anthropol* 131(3): 428-31

Brandstätter A, Salas A, Niederstätter H, Gassner C, Carracedo A, Parson W (2006)
Dissection of mitochondrial superhaplogroup H using coding region SNPs. *Electrophoresis* 27(13): 2541-2550

Brandstätter A, Parsons TJ, Parson W (2003)

Rapid screening of mtDNA coding region SNPs for the identification of west European Caucasian haplogroups. *Int J Legal Med* 117(5): 291-298

Braun A, Little DP, Köster H (1997)

Detecting CFTR gene mutations by using primer oligo base extension and mass spectrometry. *Clin Chem* 43(7): 1151-1158

Brinkmann B & Wiegand P (1997)

DNA-Technologie in der medizinischen Kriminalistik. Arbeitsmethoden der medizinischen und naturwissenschaftlichen Kriminalistik Bd 21, Schmidt-Römhild Verlag, Lübeck

Brookes AJ (1999)

The essence of SNPs. *Gene* 234(2):177-186

Brown KA, O'Donoghue K, Brown TA (1995)

DNA in cremated bones from an early bronze age cemetery cairn. *Int J Osteoarchaeology* 5: 181-187

Budimlija ZM, Prinz MK, Zelson-Mundorff A et al. (2003)

World Trade Center human identification project: experiences with individual body identification cases. *Croat Med J* 44(3): 259-263

Budowle B, Bieber FR, Eisenberg AJ (2005)

Forensic aspects of mass disasters: strategic considerations for DNA-based human identification. *Leg Med (Tokyo)* 7(4):230-243

Budowle B (2004a)

SNP typing strategies. *Forensic Sci Int* 146S: 139-142

Budowle B, Planz JV, Campbell RS, Eisenberg AJ (2004b)

Single nucleotide polymorphisms and microarray technology in forensic genetics – development and application to mitochondrial DNA. *Forensic Sci Rev* 16: 22-36

Budowle B, DiZinno JA, Wilson MR.

Interpretation guidelines for mitochondrial DNA sequencing. Publication number 99-12 of the Laboratory Division of the federal Bureau of Investigation

Buselmaier W & Tariverdian G (2006)

Humangenetik für Biologen. Springer Verlag Heidelberg

Burger J, Hummel S, Herrmann B, Henke W (1999)

DNA preservation: a microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. *Electrophoresis* 20: 1722-1728

Butler JM (2005)

Forensic DNA Typing. Biology, Technology, and Genetics of STR Markers. 2. Auflage, Elsevier Academic Press

Butler JM, Shen Y, McCord BR (2003)

The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *J Forensic Sci* 48: 1054-1064

Campbell NA (1997)

Biologie. Spektrum Akademischer Verlag

Cann RL, Stoneking M, Wilson AC (1987)

Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 325: 31-36

Capelli C, Tschentscher F, Pascali VL (2003)

“Ancient” protocols for the crime scene? Similarities and differences between forensic genetics and ancient DNA analysis. *Forensic Sci Int* 131(1): 59-64

Cappellini E, Chiarelli B, Sineo L, Casoli A, Di Gioia A, Vernesi C, Biella MC, Caramelli (2004)

Biomolecular study of the human remains from tomb 5859 in the Etruscan necropolis of Monterozzi, Tarquinia (Viterbo, Italy). *J Archaeological Sci* 31: 603-612

Carracedo A, Bär W, Lincoln P, Mayr W, Morling N, Olaisen B, Schneider P, Budowle B, Brinkmann B, Gill P, Holland M, Tully G, Wilson M (2000)

DNA commission of the international society for forensic genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Sci Int* 110(2): 79-85

Cattaneo C, DiMartino S, Scali S, Craig OE, Grandi M, Sokol RJ (1999)

Determining the human origin of fragments of burnt bone: a comparative study of histological, immunological and DNA techniques. *Forensic Sci Int* 102: 181-191

Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, Piazza A (1994)

The History and Geography of Human Genes. Princeton Univ Press, Princeton/NJ.

Cipollaro M, Galderisi U, Di Bernardo G (2005)

Ancient DNA as a multidisciplinary experience. *J of Cell Physiology* 202: 315-322

Coble MD, Just RS, O`Callaghan JE, Letmanyi IH, Peterson CT, Irwin JA, Parsons TJ (2004)

Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians. *Int J Legal Med* 118(3): 137-146

Copeland AR (1985)

Suicidal fire deaths revisited. *Z Rechtsmed* 95(1): 51-57

Davoren J, Vanek D, Konjhodzic R, Crews J, Huffine E, Parsons TJ (2007)

Highly effective DNA extraction method for nuclear short tandem repeat testing of skeletal remains from mass graves. *Croat Med J* 48(4): 478-85

Deng YJ, Li YZ, Yu XG, Li L, Wu DY, Zhou J, Man TY, Yang G, Yan JW, Cai DQ, Wang J, Yang HM, Li SB, Yu J (2005)

Preliminary DNA identification for the tsunami victims in Thailand. *Genomics. Proteomics Bioinformatics* 3(3): 143-157

Devlin JB & Herrmann NP (2008)

Bone color as an interpretive tool of the depositional History of Archaeological Cremains. In: Schmidt CW und Symes SA (ed) *The Analysis of Burned Human Remains*, Elsevier Academic Press, London, S. 109-129

DiMaio DJ & DiMaio VJM (1993)

Forensic Pathology, 1st edn CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo

Dixon LA, Dobbins AE, Pilker HK, Butler JM, Vallone PM, Coble MD, Parson W, Berger B, Grubwieser P, Mogensen HS, Morling N, Nielsen K, Sanchez JJ, Petkovski E, Carracedo A, Sanchez-Diz P, Ramos-Luis E, Brion M, Irwin JA, Just RS, Loreille O, Parsons TJ, Syndercombe-Court D, Schmitter H, Stradmann-Bellinghausen B, Bender K, Gill P (2006) Analysis of artificially degraded DNA using STRs and SNPs – results of a collaborative European (EDNAP) exercise. *Forensic Sci Int* 164(1): 33-44

Faller A & Schünke M (2004)

Der Körper des Menschen. Einführung in Bau und Funktion. 14. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Fanton L, Jdeed K, Tilhet-Coartet S, Malicier D (2006)

Criminal burning. *Forensic Sci Int* 158: 87-93

Finnilä S, Lehtonen MS, Majamaa K (2001)

Phylogenetic network for European mtDNA. *Am J Hum Genet* 68(6): 1475-1484

Fondevila M, Phillips C, Naveran N, Fernandez L, Cerezo M, Salas A, Carracedo A, Lareu MV (2008)

Case report: identification of skeletal remains using short-amplicon marker analysis of severely degraded DNA extracted from a decomposed and charred femur. *Forensic Sci Int Genet* 2(3): 212-218

Foran DR (2006)

Relative degradation of nuclear and mitochondrial DNA: an experimental approach. *J Forensic Sci* 51(4): 766-770

Garcia-Bour J, Perez-Perez A, Alvarez S, Fernandes E, Lopez-Parra AM, Arroyo-Pardo E, Turbon D (2004)

Early population differentiation in extinct aborigines from Tierra del Fuego-Patagonia: ancient mtDNA sequences and Y-chromosome STR characterization. *Am J Phys Anthropol* 123(4): 361-370

Gilbert MTP, Rudbeck L, Willerslev E, Hansen AJ, Smith C, Penkman KEH, Prangenberg K, Nielsen-Marsh CM, Jans ME, Arthur P, Lynnerup N, Turner-Walker G, Biddle M, Kjølbye-Biddle B, Collins MJ (2005)

Biochemical and physical correlates of DNA contamination in archaeological human bones and teeth excavated at Matera, Italy. *J Archaeological Sci* 32: 785-793

Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC (1980)

Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 77(11): 6715-6719

Gill P & Kirkham A (2004)

Development of a simulation model to assess the impact of contamination in casework using STRs. *J Forensic Sci* 49(3): 485-491

Gill P (2001)

Application of low copy number DNA profiling. *Croat Med J* 42(3): 229-232

Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G, Evett I, Hagelberg E, Sullivan K (1994)

Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat Genet* 6(2): 130-135

Grignani P, Peloso G, Achilli A, Turchi C, Tagliabracci A, Alu M, Beduschi G, Ricci U, Giunti L, Robino C, Gino S, Previdere C (2006)

Subtyping mtDNA haplogroup H by SnaPshot minisequencing and its application in forensic individual identification. *Int J Legal Med* 120(3): 151-156

Grosskopf B (bislang unpubliziert)

Leichenbrand – Biologisches und kulturhistorisches Quellenmaterial zur Rekonstruktion vor- und frühgeschichtlicher Populationen und ihrer Funeralpraktiken. Dissertation an der Fakultät für Geschichte, Kunst- und Orientwissenschaften der Universität Leipzig

Grupe G, Christiansen K, Schröder I, Wittwer-Backofen U (2005)

Anthropologie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg

Gutierrez G, Sanchez D, Marin A (2002)

A reanalysis of the ancient mitochondrial DNA sequences recovered from Neandertal bones. *Mol Biol Evol* 19(8): 1359-1366

Haas H, Budowle B, Weiler G (1994)

Horizontal polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Electrophoresis* 15(2): 153-158

Hagelberg E & Clegg JB (1991)

Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proc Biol Sci* 244: 45-50

Hall A & Ballantyne J (2004)

Characterization of UVC-induced DNA damage in bloodstains: forensic implications. *Anal Bioanal Chem* 380(4): 72-83

Handt O, Krings M, Ward RH, Pääbo S (1996)

The retrieval of ancient human DNA sequences. *Am J Hum Genet* 59: 368-376

Herrmann B (1992)

Behandlung von Leichenbrand. In Knußmann (Hrsg.): *Anthropologie I/1*, 4. Auflage. Fischer Verlag. S. 576-585

Herrmann B, Grupe G, Hummel S, Piepenbrink H, Schutkowski H (1990)

Prähistorische Anthropologie – Leitfaden der Feld- und Labormethoden. Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Higuchi R, Bowman B, Freiberger M, Ryder OA, Wilson AC (1984)

DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 312: 282-284.

Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, Kuch M, Pääbo S (2001)

Ancient DNA. *Nat Rev Genet* 2(5): 353-359

- Holland MM**, Cave CA, Holland CA, Bille TW (2003)
Development of a quality, high throughput DNA analysis procedure for skeletal samples to assist with the identification of victims from the World Trade Center attacks. *Croat Med J* 44(3): 264-272
- Höss M**, Jaruga P, Zastawny TH, Dizdaroğlu M, Pääbo S (1996)
DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Res* 24(7): 1304-1307
- Hummel S** (2003)
Ancient DNA Typing. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York
- Hummel S**, Schultes T, Gerstenberger J (2001)
DNA-Analysen an Skelettfunden – Von der DNA-Extraktion zum genetischen Fingerabdruck. In: Oehmichen M & Geserick G (Hrsg) Osteologische Identifikation und Altersschätzung. Research in Legal Medicine, Vol 26, Schmidt-Römhild Verlag, Lübeck
- Hummel S**, Schultes T, Bramanti B, Herrmann B (1999)
Ancient DNA profiling by megaplex amplifications. *Electrophoresis* 20: 1717-1721
- Hunger H**, Dürwald W, Tröger HD (1993)
Lexikon der Rechtsmedizin. Barth, Heidelberg
- Ingman M**, Kaessmann H, Pääbo S, Gyllenstein U (2000)
Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature* 408: 708-713
- Janssen W** (1977)
Schädigung durch Hitze und Kälte. In: Janssen W, Forensische Histologie. Schmidt-Römhild Verlag, Lübeck
- Johnson PH**, Olson CB, Goodman M (1985)
Isolation and characterization of desoxyribonucleic acid from tissue of the woolly mammoth, *Mammuthus primigenius*. *Comp Biochem Physiol B* 81(4): 1045-1051
- Just R**, Irwin JA, O'Callaghan JE, Saunier JL, Coble MD, Vallone PM, Butler JM, Barritt SM, Parsons TJ (2004)
Toward increased utility of mtDNA in forensic identifications. *Forensic Science Int* 146S: 147-149
- Kalmar T**, Bachrati CZ, Marcsik A, Rasko I (2000)
A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones. *Nucleic Acids Res* 28(12): E67
- Kadenbach B**, Münscher C, Frank V, Müller-Höcker J, Napiwotzki J (1995)
Human aging is associated with stochastic somatic mutations of mitochondrial DNA. *Mutat Res* 338: 161-172
- Kemp BM** & Smith DG (2005)
Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. *Forensic Sci Int* 154(1): 53-61

Keyser-Tracqui C, Crubezy E, Ludes B (2003)

Nuclear and mitochondrial DNA analysis of a 2,000-year-old necropolis in the Egyin Gol Valley of Mongolia. *Am J Hum Genet* 73(2): 247-260

Kloosterman AD & Kersbergen P (2003)

Efficacy and limits of genotyping low copy number (LCN) DNA samples by multiplex PCR of STR loci. *J Soc Biol* 197(4): 351-359

Köhnemann S, Sibbing U, Pfeiffer H, Hohoff C (2008)

A rapid mtDNA assay of 22 SNPs in one multiplex reaction increases the power of forensic testing in European Caucasians. *Int J Legal Med* 122(6): 517-523

Kolman CJ & Tuross N (2000)

Ancient DNA analysis of human populations. *Am J Phys Anthropol* 111(1): 5-23

Krause D & Jachau K (2003)

Späte Leichenveränderungen. In: Madea (Hrsg.) *Praxis Rechtsmedizin*. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, S. 47-50

Krause-Kyora B (2007)

Scharbeutz, Kr. Ostholstein, LA 252. Überlegungen zum Leben und Sterben anhand eines Gräberfeldes der Jastorfkultur in Schleswig-Holstein. *Starigard* 8: 23-35

Krings M, Stone A, Schmitz RW, Krainitzki H, Stoneking M, Pääbo S (1997)

Neanderthal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* 90(1): 19-30

Lalueza-Fox C, Calderon FL, Calafell F, Morera B, Bertranpetit J (2001)

MtDNA from extinct Tainos and the peopling of the Caribbean. *Ann Hum Genet* 65: 137-151

Lagler K (1989)

Sörup II und Südensee, Zwei eisenzeitliche Urnenfriedhöfe in Angeln. herausgegeben von A. Haffner, M. Müller-Wille, J. Reichstein, *Offa-Bücher Band 68*, Karl Wachholtz Verlag Neumünster

Landegren U, Nilsson M, Kwok PY (1998)

Reading bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis. *Genome Res* 8(8): 769-776

Lassen C, Hummel S, Herrmann B (1996)

PCR based sex identification of ancient human bones by amplification of X- und Y-chromosomal sequences: a comparison. *Ancient Biomol* 1: 25-33

Lee HY, Park MJ, Yoo JE, Chung U, Han GR, Shin KJ (2005)

Selection of twenty-four highly informative SNP markers for human identification and paternity analysis in Koreans. *Forensic Sci Int* 148: 107-112

Leonhardt H (1990)

Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. Taschenlehrbuch der gesamten Anatomie. Band 3. Thieme Verlag 8. Auflage

Lindahl T (1993)

Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362: 709-715

Loogväli EL, Roostalu U, Malyarchuk BA, Derenko MV, Kivisild T, Metspalu E, Tambets K, Reidla M, Tolk HV, Parik J, Pennarun E, Laos S, Lunkina A, Golubenko M, Bara L, Pericic M, Balanovsky OP, Gusar V, Khusnutdinova EK, Stepanov V, Puzyrev V, Rudan P, Balanovska EV, Grechanina E, Richard C, Moisan JP, Chaventré A, Anagnou NP, Pappa KI, Michalodimitrakakis EN, Claustres M, Gölge M, Mikerezi I, Usanga E, Villems R (2004) Disuniting Uniformity: a pied cladistic canvas of mtDNA haplogroup H in Eurasia. *Mol Biol Evol* 21(11): 2012-2021

Loreille OM, Diegoli TM, Irwin A, Coble MD, Parsons TJ (2007)

High efficiency DNA extraction from bone by total demineralisation. *Forensic Sci Int Genet* 1(2): 191-195

Lowe A, Murray C, Whitaker J, Tully G, Gill P (2002)

The propensity of individuals to deposit DNA and secondary transfer of low level DNA from individuals to inert surfaces. *Forensic Sci Int* 129(1): 25-34

Ludes B, Pfitzinger H, Mangin P (1993)

DNA fingerprinting from tissue after variable postmortem periods. *J Forensic Sci* 38(3): 686-690

Lüllmann-Rauch R (2006)

Taschenlehrbuch Histologie. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2002) *Brock Mikrobiologie*, 1. Nachdruck, Spektrum Akademischer Verlag

Marsh HP, Haldar NA, Bunce M, Marshall SE, le Monier K, Winsey SL, Christodoulos K, Cranston D, Welsh KI, Harris AL (2003)

Polymorphisms in tumor necrosis factor (TNF) are associated with risk of bladder cancer and grade of tumour at presentation. *Br J Cancer* 89(6): 1096-1101

Martin R (1996)

Labor im Fokus Elektrophorese von Nucleinsäuren. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford

Matheson CD & Loy TH (2001)

Genetic sex identification of 9400-year-old human skull from Cayonu Tepesi, Turkey. *J Archaeol Sci* 28: 569-575

McConkey (2004)

How the Human Genome Works. Jones & Bartlett Publishers Inc., U.S.

Meyer HJ (2003)

The Kaprun cable car fire disaster – aspects of forensic organisation following a mass fatality with 155 victims. *Forensic Sci Int* 138: 1-7

- Milos A**, Selmanovic A, Smajlovic L, Huel RL, Katzmarzyk C, Rizvic A, Parsons TJ (2007)
Success rates of nuclear short tandem repeat typing from different skeletal elements. *Croat Med J*. 48(4): 486-93
- Montiel R**, Malgosa A, Francalacci P (2001)
Authenticating ancient human mitochondrial DNA. *Hum Biol* 73(5): 689-713
- Moreira D** (1998)
Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparation. *Nucleic Acids Res* 26(13): 3309-3310
- Morley JM**, Bark JE, Evans CE, Perry JG, Hewitt CA, Tully G (1999)
Validation of mitochondrial DNA minisequencing for forensic casework. *Int J Legal Med* 112(4): 241-248
- Mulligan CJ** (2005)
Isolation and analysis of DNA from archaeological, clinical, and natural history specimens. *Methods Enzymol* 395: 87-103
- Mullis KB** & Faloona FA (1987)
Specific synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-catalyzed Chain Reaktion. *Methods Enzymol* 155: 335-350
- Murken J**, Grimm T, Holinski-Feder E (2006)
Taschenlehrbuch Humangenetik. 7. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart NewYork
- Musgrave-Brown E**, Ballard D, Balogh K, Bender K, Berger B, Bogus M, Børsting C, Brion M, Fondevila M, Harrison C, Oguzturun C, Parson W, Phillips C, Proff C, Ramos-Luis E, Sanchez JJ, Sanchez Diz P, Sobrino Rey B, Stradmann-Bellinghausen B, Thacker C, Carracedo A, Morling N, Scheithauer R, Schneider PM, Syndercombe Court D (2007)
Forensic validation of the SNPforID 52-plex assay. *Forensic Sci Int Genet* 1(2): 186-190
- Newton CR** & Graham A (1994)
Labor m Fokus PCR. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg Berlin Oxford
- Norton N**, Williams NM, Williams HJ, Spurlock G, Kirov G, Morris DW, Hoogendoorn B, Owen MJ, O'Donovan MC (2002)
Universal, robust, highly quantitative SNP allele frequency measurement in DNA pools. *Hum Genet* 110(5): 471-478
- Ovchinnikov IV**, Gotherstrom A, Romanova GP, Kharitonov VM, Liden K, Goodwin W (2000)
Molecular analysis of Neanderthal DNA from the northern Caucasus. *Nature* 404: 490-493
- Pääbo S**, Poinar H, Serre D, Jaenicke-Despres V, Hebler J, Rohland N, Kuch M, Krause J, Vigilant L, Hofreiter M (2004)
Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet* 38: 645-679

Patzelt D (2003)

Forensische Serologie/Molekulare Genetik. In Madea (Hrsg) Praxis Rechtsmedizin. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, S.483-526

Pfeiffer H, Forster P, Ortmann C, Brinkmann B (2001)

The results of an mtDNA study of 1,200 inhabitants of a German village in comparison to other Caucasian databases and its relevance for forensic casework. *Int J Legal Med* 114(3): 169-172

Phillips C, Salas A, Sanchez JJ, Fondevila M, Gomez-Tato A, Alvarez-Dios J, Calaza M, de Cal MC, Ballard D, Lareu MV, Carracedo A (2007)

Inferring ancestral origin using a single multiplex assay of ancestry-informative marker SNPs. *Forensic Sci Int Genet* 1: 273-280

Poinar HN (2003)

The top 10 list: criteria of authenticity for DNA from ancient and forensic samples. *Int congress series* 1239: 575-579

Prütz WA (1998)

Interactions of hypochlorous acid with pyrimidine nucleotides, and secondary reactions of chlorinated pyrimidines with GSH, NADH, and other substrates. *Arch Biochem Biophys* 349(1): 183-191

Prütz WA (1996)

Hypochlorous acid interactions with thiols, nucleotides, DNA, and other biological substrates. *Arch Biochem Biophys* 332(1): 110-120

Pusch CM, Broghammer M, Scholz M (2000)

Cremation practices and the survival of ancient DNA: burnt bone analyses via RAPD-mediated PCR. *Anthropol Anz* 58(3): 237-251

Quintans B, Alvarez-Iglesias V, Salas A, Phillips C, Lareu MV, Carracedo A (2004)

Typing of mitochondrial DNA coding region SNPs of forensic and anthropological interest using SnaPshot minisequencing. *Forensic Sci Int* 140: 251-257

Richards M, Macaulay V, Hickey E, Vega E, Sykes B, Guida V, Rengo C, Sellitto D, Cruciani F, Kivisild T, Villems R, Thomas M, Rychkov S, Rychkov O, Rychkov Y, Gölge M, Dimitrov D, Hill E, Bradley D, Romano V, et al. (2000)

Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool. *Am J Hum Genet* 67(5): 1251-1276

Robertson J, Ross AM, Burgoyne LA (1990)

DNA in forensic science: theorie, techniques and applications. Ellis Horwood Limited, England

Rogers SO & Bendich AJ (1985)

Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol Biol* 5: 69-76

Sajantila A, Ström M, Budowle B, Karhunen PJ, Peltonen L (1991)

The polymerase chain reaction and post-mortem forensic identity testing: application of amplified D1S80 and HLA-DQ alpha loci to the identification of fire victims. *Forensic Sci Int* 51(4): 23-24

Sampietro ML, Gilbert MT, Lao O, Caramelli D, Lari M, Bertranpetit J, Lalueza-Fox C (2006)

Tracking down human contamination in ancient human teeth. *Mol Biol Evol* 23(9): 1801-1807

Sanchez JJ, Phillips C, Børsting C, Balogh K, Bogus M, Fondevila M, Harrison CD, Musgrave-Brown E, Salas A, Syndercombe-Court D, Schneider PM, Carracedo A, Morling N (2006)

A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. *Electrophoresis* 27(9): 1713-1724

Schneider PM, Fimmers R, Keil W, Molsberger G, Patzelt D, Pflug W, Rothämel T, Schmitter H, Schneider H, Brinkmann B (2009)

The German Stain Commission: recommendations for the interpretation of mixed stains. *Int J Legal Med* 123(4): 1-5

Scholz M, Giddings I, Pusch CM (1998)

A polymerase chain reaction inhibitor of ancient hard and soft tissue DNA extracts is determined as human collagen type I. *Anal Biochem* 259(2): 283-286

Schünke M, Schulte E, Schumacher U (2005)

Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem. Prometheus LernAtlas der Anatomie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Schurr MR, Hayes RG, Cook DC (2008)

Thermally Induced Changes in the stable Carbon and Nitrogen Isotope Ratios of charred Bones. In: Schmidt CW und Symes SA (ed) *The Analysis of Burned Human Remains*, Elsevier Academic Press, London, S. 95-108

Schultz JJ, Warren MW, Krigbaum JS (2008)

Analysis of Human Cremains: Gross and Chemical Methods. In: Schmidt CW und Symes SA (ed) *The Analysis of Burned Human Remains*, Elsevier Academic Press, London, S. 75-94

Schwark T, Poetsch M, Prange A, Röpke M, Heinrich A, Simeoni E, von Wurmb-Schwark N (2008)

Molekulargenetische Identifizierung von Leichen: Erfahrungen und Empfehlungen bei der Auswahl von Vergleichsmaterialien. 17. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin - Region Nord, Essen V25

Sparkes R, Kimpton C, Gilbard S, Carne P, Andersen J, Oldroyd N, Thomas D, Urquhart A, Gill P (1996)

The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework. *Int J Legal Med* 109(4): 195-204

Stone AC, Starrs JE, Stoneking M (2001)

Mitochondrial DNA analysis of the presumptive remains of Jesse James. *J Forensic Sci* 46(1): 173-176

Stoneking M, Melton T, Nott J, Barritt S, Roby R, Holland M, Weedn V, Gill P, Kimpton C, Aliston-Greiner R, Sullivan K (1995)

Establishing the identity of Anna Anderson Manahan. *Nat Genet* 9: 9-10

Sutlovic D, Definis-Gojanovic M, Andelinovic S, Guric D, Primorac D (2005)

Taq polymerase reverses inhibition of quantitative real time polymerase chain reaction by humic acid. *Croat Med J* 46(4): 556-562

Symes SA, Rainwater CW, Chapman EN, Gipson DR, Piper AL (2008)

Patterned Thermal Destruction of Human Remains in a Forensic Setting. In: Schmidt CW und Symes SA (ed) *The Analysis of Burned Human Remains*, Elsevier Academic Press, London, S. 15-55

Vallone PM, Just RS, Coble MD, Butler JM, Parsons TJ (2004)

A multiplex allele-specific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome. *Int J Legal Med* 118(3): 147-157

Wahl J (1988)

Süderbrarup – Ein Gräberfeld der römischen Kaiserzeit und Völkerwanderungszeit in Angeln II. Anthropologische Untersuchungen. Offa-Bücher Band 64, Karl-Wachholtz Verlag Neumünster

Watt KE (2005)

Decontamination techniques in ancient DNA analysis. Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Arts in the Department of Archaeology, Simon Fraser University, Burnaby BC, Canada

Weichhold GM, Bark JE, Korte W, Eisenmenger W, Sullivan KM (1998)

DNA analysis in the case of Kasper Hauser. *Int J Legal Med* 111(6): 287-291

Weispfenning R (2004)

STR Workshop Handbuch. Promega GmbH Mannheim.

Willerslev E & Cooper A (2005)

Ancient DNA. *Proc Biol Sci* 272: 3-16

von Wurmb-Schwark N, Preusse-Prange A, Heinrich A, Simeoni E, Bosch T, Schwark T (2009)

A new multiplex-PCR comprising autosomal and y-specific STRs and mitochondrial DNA to analyze highly degraded material. *Forensic Sci Int Genet* 3(2): 96-103

von Wurmb-Schwark N, Schwark T, Harbeck M, Oehmichen M (2004)

A simple Duplex-PCR to evaluate the DNA quality of anthropological and forensic samples prior short tandem repeat typing. *Leg Med (Tokyo)* 6(2): 80-88

Yu N, Chen FC, Ota S, Jorde LB, Pamilo P, Patthy L, Ramsay M, Jenkins T, Shyue SK, Li WH (2002)

Larger genetic differences within Africans than between Africans und Eurasians. *Genetics* 161(1): 269-274

Zerjal T, Dashnyam B, Pandya A, Kayser M, Roewer L, Santos FR, Schiefenhövel W, Fretwell N, Joblin MA, Harihara S, Shimizu K, Semjidsmaa D, Sajantila A, Salo P, Crawford MH, Ginter EK, Evgrafov OV, Tyler-Smith C (1997)

Genetic relationships of Asians and Northern Europeans, revealed by Y-chromosomal DNA analysis. *Am J Hum Genet* 60(5): 1174-1183

12.2 Internetquellen

- www.mitomap.org
- www.igene.com
- www.biologiezentrum.at/mpdh/mypersonaldnahistory.php,
- www.gerichtsmedizin.at/friedrichschillercode.html

12.3 Herstellerprotokolle

- Application Guide No. 17. Genomic DNA Isolation from dental pulp and hard tissues (teeth and bones) QuickGene DNA tissue kit S. von Fujifilm und QuickGene
- Quantifiler Kits User`s Manual (2006) Applied Biosystems
- ABI Prism® SNaPshot™ Multiplex Kit Protocol (2000) Applied Biosystems

Danksagung

Ich möchte mich bei allen denen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben.

Vor allem bedanke ich mich bei meiner wissenschaftlichen Betreuerin, Frau Jun. Prof. Dr. Nicole von Wurmb-Schwark, für die freundliche Überlassung des fachlichen Themas, ihren fachlichen Rat, die unermüdliche und engagierte Unterstützung in Form von anregenden, zeitintensiven Gesprächen, den freundschaftlichen Umgang und den oft Mut machenden Worten.

Desgleichen bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Manuela Dittmar, die mir in ihrer Funktion als Referentin ebenfalls wertvolle Hinweise und Tipps nach Durchsicht meiner Dissertation geben konnte.

Großen Dank schulde ich auch Frau PD Dr. Micaela Poetsch und PD Dr. Jeanette Edelmann für die großzügige Bereitstellung des Probenmaterials. Insbesondere Frau Dr. M. Poetsch möchte ich auf diesem Weg nochmals für ihre Hilfsbereitschaft und das freundliche Kommunizieren bei der Etablierung der SNP-Analyse danken.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. Michael Gebühr für seine Bereitschaft mich bei der Auswahl der Gräberfelder und den archäologischen Fragestellungen zu unterstützen.

Frau Frauke Steen danke ich für ihre freundschaftliche Hilfe bei Probenentnahmen im Sektionssaal, speziell –aber nicht nur- bei präparatorisch aufwendigen Fällen.

Des Weiteren geht mein Dank an Herrn Hinriksen aus der Werkstatt des Landesmuseums Schleswig-Holstein, der mich bei der Bergung des Leichenbrandes aus den Urnen tatkräftig unterstützte.

Für ihre Hilfsbereitschaft und Schaffung einer freundlichen Arbeitsatmosphäre, die einen harmonischen Tagesablauf gewährleisteten, möchte ich in meine Danksagung Andrea Preusse-Prange, Melanie Röpke, Stefanie Petzel, Marion Matthiesen und Ingrid Wessel gern mit einbeziehen.

Das Resümee nach der Erstellung dieser Arbeit ist die Feststellung, dass wesentlich die fachliche Beratung und handwerkliche Unterstützung sowie der positive Teamgeist aller an der Dissertationsschrift beteiligten zum Gelingen beigetragen haben.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Anke Heinrich
Geburtsdatum: 08.10.1981
Geburtsort: Stendal
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schul Ausbildung

1988-1992: Grundschule „Am Stadtsee“ Stendal
1992-2000: Winckelmann-Gymnasium, Stendal

Studium

2000-2005: Biologiestudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
2005: Diplomprüfung im Hauptfach Anthropologie und den
Nebenfächern Zoologie und Rechtsmedizin
2005-2006: Anfertigung der Diplomarbeit am Zoologischen Institut /
Universität Kiel mit dem Thema „Urnengräberfelder in
Schleswig Holstein: Möglichkeiten und Grenzen der DNA-
Analyse bei Leichenbränden“.
Seit 2006: Anfertigung der Doktorarbeit am Zoologischen Institut /
Universität Kiel mit dem Thema „Molekulargenetische
Analysen aus historischem Leichenbrand und stark degradiertem
humanen Material“.

Veröffentlichungen

von Wurmb-Schwark N, Heinrich A, Freudenberg M, Gebühr M, Schwark T
The impact of DNA contamination of bone samples in forensic case analysis and
anthropological reasearch.
Leg Med (Tokyo). 2008 May;10(3):125-30.

Heinrich A, Preusse-Prange A, Schwark Th, von Wurmb-Schwark N
DNA-Typing of burned bones
International Journal of Legal Medicine, submitted

Vorträge und Poster

von Wurmb-Schwark N, Heinrich A, Schwark Th, Freudenberg M, Gebühr M
The problem of DNA contamination of bone samples for forensic or anthropological research
and case analysis.
85th Annual Meeting of the German Society of Legal Medicine and DNA in Forensics, 2006,
Innsbruck

Heinrich A, Prange A, Schwark Th, Simeoni E, von Wurmb-Schwark N
Molekulargenetische Typisierung von verbrannten humanen Knochen
16. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin – Region Nord, 2007,
Hamburg

Heinrich A, Schwark T, Prange A, Simeoni E, von Wurmb-Schwark N
Genetic Investigation of highly decomposed bodies: bone or soft tissue analysis?
22nd Congress of the International Society for Forensic Genetics (ISFG), 2007, Kopenhagen,
P294

Heinrich A, Schwark T, von Wurmb-Schwark N
Genetic identification of fire deaths.
International Society for Forensic Genetics (ISFG), Sept. 2009, Buenos Aires
(Poster angenommen)

Heinrich A, Schwark T, Simeoni E, von Wurmb-Schwark N
Brandleichen – welche Analyseverfahren ist am Besten geeignet.
88. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, Sept. 2009, Basel
(Vortrag angenommen)

Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass die vorliegende Arbeit, mit dem Titel „Molekulargenetische Analysen aus historischem Leichenbrand und stark degradiertem humanen Material“, abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer, nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist, und dass ich keine anderen Hilfsmittel und Quellen, als angegeben, verwendet habe.

Ich habe bisher noch kein anderes Promotionsverfahren begonnen und diese Arbeit hat bisher weder ganz noch in Teilen an anderer Stelle im Rahmen eines Promotionsverfahren vorgelegen. Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder zur Publikation eingereicht.

Datum

Unterschrift